

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局(43) 国際公開日  
2001年3月8日 (08.03.2001)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 01/16309 A1(51) 国際特許分類: C12N 15/09, C07K 14/705,  
16/28, C12N 1/21, 5/10, C12P 21/02, 21/08, C12Q 1/68,  
A61K 45/00, A61P 43/00靖 (SHINTANI, Yasushi) [JP/JP]; 〒305-0821 茨城県つ  
くば市春日1丁目7番地9-703号 Ibaraki (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP00/05685

(74) 代理人: 弁理士 高橋秀一, 外(TAKAHASHI, Shuichi  
et al.); 〒532-0024 大阪府大阪市淀川区十三本町2丁  
目17番85号 武田薬品工業株式会社 大阪工場内 Osaka  
(JP).

(22) 国際出願日: 2000年8月24日 (24.08.2000)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AU, AZ, BA, BB, BG,  
BR, BY, BZ, CA, CN, CR, CU, CZ, DM, DZ, EE, GD, GE,  
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LT,  
LV, MA, MD, MG, MK, MN, MX, MZ, NO, NZ, PL, RO,  
RU, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, US, UZ, VN, YU,  
ZA.

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願平11/241531 1999年8月27日 (27.08.1999) JP  
特願2000/217474 2000年7月18日 (18.07.2000) JP(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW,  
MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM,  
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許  
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,  
LU, MC, NL, PT, SE), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI,  
CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 武田薬品  
工業株式会社 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES,  
LTD.) [JP/JP]; 〒541-0045 大阪府大阪市中央区道修町  
四丁目1番1号 Osaka (JP).

(72) 発明者; および

添付公開書類:

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 渡辺卓也  
(WATANABE, Takuya) [JP/JP]; 〒532-0033 大阪府大  
阪市淀川区新高6丁目14番9-B904号 Osaka (JP). 寺尾  
寧子 (TERAO, Yasuko) [JP/JP]; 〒305-0034 茨城県つ  
くば市大字小野崎985番地-307号 Ibaraki (JP). 新谷

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される  
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語  
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: NOVEL G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR PROTEIN AND DNA THEREOF

(54) 発明の名称: 新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質およびそのDNA

MITI	AVITGACERD LQCGKGTCCA VSLWIKSVRY CTPVGTSGED CHPASHKIPF
Human (A type)	AVITGACERD VQCGAGTCCA ISLWLRGLRW CTPLGRECEE CHPGSHKIPF
Human (G type)	AVITGACERD VQCGAGTCCA ISLWLRGLRW CTPLGRECEE CHPGSHKVPF

MITI	SGQRWHTCP CAPHLACYQT SPKKFKCLSK
Human (A type)	FRKRKHHTCP CLPNLLCSRF POGRYCSMD LKRNIF
Human (G type)	FRKRKHHTCP CLPNLLCSRF POGRYCSMD LKRNIF

(57) Abstract: A human-origin protein or its salt: a  
DNA encoding this protein; a method of determining  
a ligand to the above protein; a method/kit for screening  
compounds capable of altering the binding properties  
of the ligand to the protein; the compounds obtained by  
the screening or salts thereof; etc. The above-described  
human-origin protein or the DNA encoding the same  
can be used in: (1) determining a ligand to this protein;(2) preventives and/or remedies for diseases in association with the dysfunction of the above protein; (3) screening compounds  
(agonists, antagonists, etc.) capable of altering binding properties of the ligand to the protein; etc.

[続葉有]

WO 01/16309 A1



---

(57) 要約:

ヒト由来の蛋白質またはその塩、該蛋白質をコードするDNA、該蛋白質に対するリガンドの決定方法、リガンドと該蛋白質との結合性を变化させる化合物のスクリーニング方法／スクリーニング用キット、該スクリーニングで得られる化合物またはその塩などに関する。

本発明のヒト由来の蛋白質またはそれをコードするDNAは、(1) 本発明の蛋白質に対するリガンドの決定、(2) 本発明の蛋白質の機能不全に関連する疾患の予防および／または治療剤 (3) 本発明の蛋白質とリガンドとの結合性を变化させる化合物 (アゴニスト、アンタゴニストなど) のスクリーニングなどに用いることができる。

## 明細書

## 新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質およびそのDNA

## 5 技術分野

本発明は、ヒト脳由来の新規蛋白質（G蛋白質共役型レセプター蛋白質）またはその塩およびそれをコードするDNAなどに関する。

## 背景技術

- 10 多くのホルモンや神経伝達物質は、細胞膜に存在する特異的なレセプター蛋白質を通じて生体の機能を調節している。これらのレセプター蛋白質の多くは共役しているguanine nucleotide-binding protein（以下、G蛋白質と略称する場合がある）の活性化を通じて細胞内のシグナル伝達を行ない、また7個の膜貫通領域を有する共通した構造をもっていることから、G蛋白質共役型レセ
- 15 プター蛋白質あるいは7回膜貫通型レセプター蛋白質と総称される。

G蛋白質共役型レセプター蛋白質は生体の細胞や臓器の各機能細胞表面に存在し、それら生体の細胞や臓器の機能を調節する分子、例えばホルモン、神経伝達物質および生理活性物質等の標的として非常に重要な役割を担っている。

- 20 各種生体の細胞や臓器の内の複雑な機能を調節する物質と、その特異的レセプター蛋白質、特にG蛋白質共役型レセプター蛋白質との関係を明らかにすることは、各種生体の細胞や臓器の機能を解明し、それら機能と密接に関連した医薬品開発に非常に重要な手段を提供することとなる。

- 例えば、脳などの中枢神経系の器官では、多くのホルモン、ホルモン様物質、神経伝達物質あるいは生理活性物質などによる調節のもとで脳の生理的な機能
- 25 の調節が行なわれている。特に、神経伝達物質は脳内の様々な部位に存在し、それぞれに対応するレセプター蛋白質を通してその生理機能の調節を行っている。脳内には未だ未知の神経伝達物質も多く、そのレセプター蛋白質をコードするcDNAの構造に関しても、これまで報告されていないものも多いと考え

られる。さらに、既知のレセプター蛋白質のサブタイプが存在するかどうかについて分かっていなかった。

脳における複雑な機能を調節する物質と、その特異的レセプター蛋白質との関係を明らかにすることは、医薬品開発に非常に重要な手段である。また、レセプター蛋白質に対するアゴニスト、アンタゴニストを効率よくスクリーニングし、医薬品を開発するためには、脳内で発現しているレセプター蛋白質の遺伝子の機能を解明し、それらを適当な発現系で発現させることが必要であった。

近年、生体内で発現している遺伝子を解析する手段として、cDNAの配列をランダムに解析する研究が活発に行なわれており、このようにして得られたcDNAの断片配列がExpressed Sequence Tag (EST) としてデータベースに登録され、公開されている。しかし、多くのESTは配列情報のみであり、その機能を推定することは困難である。

#### 発明の開示

本発明は、ヒト脳由来の新規蛋白質（G蛋白質共役型レセプター蛋白質）、その部分ペプチドまたはそれらの塩、該蛋白質またはその部分ペプチドをコードするDNAを含有するDNA、該DNAを含有する組換えベクター、該組換えベクターで形質転換された形質転換体、該蛋白質またはその塩の製造法、該蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらの塩に対する抗体、該蛋白質（G蛋白質共役型レセプター蛋白質）に対するリガンドの決定方法、リガンドと該蛋白質（G蛋白質共役型レセプター蛋白質）との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、該スクリーニング用キット、該スクリーニング方法もしくはスクリーニングキットを用いて得られるリガンドと該蛋白質（G蛋白質共役型レセプター蛋白質）との結合性を変化させる化合物またはその塩、およびリガンドと該蛋白質（G蛋白質共役型レセプター蛋白質）との結合性を変化させる化合物またはその塩を含有してなる医薬などを提供する。

本発明者らは、鋭意研究を重ねた結果、ヒト脳由来の新規な蛋白質（G蛋白質共役型レセプター蛋白質）をコードするcDNAを単離し、全塩基配列を解

析することに成功した。そして、この塩基配列をアミノ酸配列に翻訳したところ、第1～第7膜貫通領域が疎水性プロット上で確認され、これらのcDNAにコードされる蛋白質が7回膜貫通型のG蛋白質共役型レセプター蛋白質であることを確認した(図3)。本発明者らは、これらの知見に基づいて、さらに

5 研究を重ねた結果、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、

(1) 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とする蛋白質またはその塩、

(2) 上記(1)記載の蛋白質の部分ペプチドまたはその塩、

10 (3) 上記(1)記載の蛋白質をコードするDNAを含有するDNA、

(4) 配列番号：2または配列番号：3で表される塩基配列を有する上記(3)記載のDNA、

(5) 上記(3)記載のDNAを含有する組換えベクター、

(6) 上記(5)記載の組換えベクターで形質転換された形質転換体、

15 (7) 上記(6)記載の形質転換体を培養し、上記(1)記載の蛋白質を生成・蓄積せしめることを特徴とする上記(1)記載の蛋白質またはその塩の製造法、

(8) 上記(1)記載の蛋白質もしくは上記(2)記載の部分ペプチドまたはその塩に対する抗体、

20 (9) 上記(1)記載の蛋白質もしくは上記(2)記載の部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする上記(1)記載の蛋白質またはその塩に対するリガンドの決定方法、

(10) 上記(1)記載の蛋白質もしくは上記(2)記載の部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とするリガンドと上記(1)記載の蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

25 (11) 上記(1)記載の蛋白質もしくは上記(2)記載の部分ペプチドまたはその塩を含有することを特徴とするリガンドと上記(1)記載の蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キット、

(12) 上記(10)記載のスクリーニング方法または上記(11)記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、リガンドと上記(1)記載の蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩、

5 (13) 上記(10)記載のスクリーニング方法または上記(11)記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、リガンドと上記(1)記載の蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩を含有してなる医薬、および

(14) 上記(3)記載のDNAとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAなどを提供する。

10 より具体的には、

(15) 蛋白質が、①配列番号：1で表わされるアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～9個程度、さらに好ましくは数個（1または2個））のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、②配列番号：1で表わされるアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1～  
15 30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個（1または2個））のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、③配列番号：1で表わされるアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個（1または2個））のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または④それらを組み合わせたア  
20 ミノ酸配列を含有する蛋白質である上記(1)記載の蛋白質またはその塩、

(16) 上記(1)記載の蛋白質もしくはその塩または上記(2)記載の部分ペプチドもしくはその塩と、試験化合物とを接触させることを特徴とする上記(10)記載のリガンドの決定方法、

(17) リガンドがアンギオテンシン、ボンベシン、カナビノイド、コレシストキニン、グルタミン、セロトニン、メラトニン、ニューロペプチドY、オピ  
25 オイド、プリン、バソプレッシン、オキシトシン、PACAP、セクレチン、グルカゴン、カルシトニン、アドレノメジュリン、ソマトスタチン、GHRH、CRF、ACTH、GRP、PTH、VIP（バソアクティブ インテスティ

ナル アンド リレイテッド ポリペプチド)、ソマトスタチン、ドーパミン、モチリン、アミリン、ブラジキニン、CGRP (カルシトニンジーンリレーテッドペプチド)、ロイコトリエン、パンクレアスタチン、プロスタグランジン、トロンボキサン、アデノシン、アドレナリン、 $\alpha$ および $\beta$ -ケモカイン (chemokine) (例えば、IL-8、GRO $\alpha$ 、GRO $\beta$ 、GRO $\gamma$ 、NAP-2、ENA-78、PF4、IP10、GCP-2、MCP-1、HC14、MCP-3、I-309、MIP1 $\alpha$ 、MIP-1 $\beta$ 、RANTESなど)、エンドセリン、エンテログاستリン、ヒスタミン、ニューロテンシン、TRH、パンクレアティックポリペプチド、ガラニン、Mamba Intestinal Toxin 1 (MIT1と略称することがある; Toxicon、28巻、847-856頁、1990年、FEBS Letters 461, 183-188 (1999)) またはその哺乳動物のホモログである上記(9)記載のリガンドの決定方法、

(18) (i) 上記(1)記載の蛋白質もしくはその塩または上記(2)記載の部分ペプチドもしくはその塩と、リガンドとを接触させた場合と、(ii) 上記(1)記載の蛋白質もしくはその塩または上記(2)記載の部分ペプチドもしくはその塩と、リガンドおよび試験化合物とを接触させた場合との比較を行なうことを特徴とする上記(11)記載のスクリーニング方法、

(19) (i) 標識したリガンドを上記(1)記載の蛋白質もしくはその塩または上記(2)記載の部分ペプチドもしくはその塩に接触させた場合と、(ii) 標識したリガンドおよび試験化合物を上記(1)記載の蛋白質もしくはその塩または上記(2)記載の部分ペプチドまたはその塩に接触させた場合における、標識したリガンドの上記(1)記載の蛋白質もしくはその塩または上記(2)記載の部分ペプチドもしくはその塩に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと上記(1)記載の蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

(20) (i) 標識したリガンドを上記(1)記載の蛋白質を含有する細胞に接触させた場合と、(ii) 標識したリガンドおよび試験化合物を上記(1)記載の蛋白質を含有する細胞に接触させた場合における、標識したリガンドの該

細胞に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと上記（１）記載の蛋白質またはその塩との結合性を变化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

（２１）（ｉ）標識したリガンドを上記（１）記載の蛋白質を含有する細胞の膜画分に接触させた場合と、（ii）標識したリガンドおよび試験化合物を上記（１）記載の蛋白質を含有する細胞の膜画分に接触させた場合における、標識したリガンドの該細胞の膜画分に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと上記（１）記載の蛋白質またはその塩との結合性を变化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

（２２）（ｉ）標識したリガンドを上記（６）記載の形質転換体を培養することによって該形質転換体の細胞膜に発現した蛋白質に接触させた場合と、（ii）標識したリガンドおよび試験化合物を上記（６）記載の形質転換体を培養することによって該形質転換体の細胞膜に発現した蛋白質に接触させた場合における、標識したリガンドの該蛋白質に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと上記（１）記載の蛋白質またはその塩との結合性を变化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

（２３）（ｉ）上記（１）記載の蛋白質またはその塩を活性化する化合物を上記（１）記載の蛋白質を含有する細胞に接触させた場合と、（ii）上記（１）記載の蛋白質またはその塩を活性化する化合物および試験化合物を上記（１）記載の蛋白質を含有する細胞に接触させた場合における、蛋白質を介した細胞刺激活性を測定し、比較することを特徴とするリガンドと上記（１）記載の蛋白質またはその塩との結合性を变化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

（２４）上記（１）記載の蛋白質またはその塩を活性化する化合物を上記（６）記載の形質転換体を培養することによって該形質転換体の細胞膜に発現した蛋白質に接触させた場合と、上記（１）記載の蛋白質またはその塩を活性化する化合物および試験化合物を上記（６）記載の形質転換体を培養することによって該形質転換体の細胞膜に発現した蛋白質に接触させた場合における、該蛋白



質を介する細胞刺激活性を測定し、比較することを特徴とするリガンドと上記

(1) 記載の蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

- (25) 上記(1) 記載の蛋白質を活性化する化合物が、アンギオテンシン、  
5 ボンベシン、カナビノイド、コレシストキニン、グルタミン、セロトニン、メラトニン、ニューロペプチドY、オピオイド、プリン、バソプレッシン、オキシトシン、PACAP、セクレチン、グルカゴン、カルシトニン、アドレノメジュリン、ソマトスタチン、GHRH、CRF、ACTH、GRP、PTH、VIP (バソアクティブ インテスティナル アンド リレイテッド ポリペ  
10 プチド)、ソマトスタチン、ドーパミン、モチリン、アミリン、ブラジキニン、CGRP (カルシトニンジーンリレーティッドペプチド)、ロイコトリエン、パンクレアスタチン、プロスタグランジン、トロンボキサン、アデノシン、アドレナリン、 $\alpha$ および $\beta$ -ケモカイン (chemokine) (例えば、IL-8、GRO $\alpha$ 、GRO $\beta$ 、GRO $\gamma$ 、NAP-2、ENA-78、PF4、IP10、  
15 GCP-2、MCP-1、HC14、MCP-3、I-309、MIP1 $\alpha$ 、MIP-1 $\beta$ 、RANTESなど)、エンドセリン、エンテログアストリン、ヒスタミン、ニューロテンシン、TRH、パンクレアティックポリペプチド、ガラニン、MITIまたはその哺乳動物のホモログである上記(23) または上記  
(24) 記載のスクリーニング方法、

- 20 (26) 上記(18) ~ (25) 記載のスクリーニング方法で得られうる、リガンドと上記(1) 記載の蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩、

- (27) 上記(18) ~ (25) 項記載のスクリーニング方法で得られうる、  
リガンドと上記(1) 記載の蛋白質またはその塩との結合性を変化させるの化  
25 合物またはその塩を含有することを特徴とする医薬、

(28) 上記(1) 記載の蛋白質を含有する細胞を含有することを特徴とする  
上記(11) 記載のスクリーニング用キット、

(29) 上記(1) 記載の蛋白質を含有する細胞の膜画分を含有することを特

徴とする上記（１１）記載のスクリーニング用キット、

（３０）上記（６）記載の形質転換体を培養することによって該形質転換体の細胞膜に発現した蛋白質を含有することを特徴とする上記（１１）記載のスクリーニング用キット、

- 5   （３１）上記（２８）～（３０）記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、リガンドと上記（１）記載の蛋白質またはその塩との結合性を变化させる化合物またはその塩、

（３２）上記（２８）～（３０）記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、リガンドと上記（１）記載の蛋白質またはその塩との結合性を变化さ

- 10   せる化合物またはその塩を含有することを特徴とする医薬、

（３３）上記（８）記載の抗体と、上記（１）記載の蛋白質もしくは上記（２）記載の部分ペプチドまたはその塩とを接触させることを特徴とする上記（１）記載の蛋白質もしくは上記（２）記載の部分ペプチドまたはその塩の定量法、

- （３４）上記（８）記載の抗体と、被検液および標識化された上記（１）記載  
15   の蛋白質もしくは上記（２）記載の部分ペプチドまたはその塩とを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識化された上記（１）記載の蛋白質もしくは上記（２）記載の部分ペプチドまたはその塩の割合を測定することを特徴とする被検液中の上記（１）記載の蛋白質もしくは上記（２）記載の部分ペプチドまたはその塩の定量法、および

- 20   （３５）被検液と担体上に不溶化した上記（８）記載の抗体および標識化された上記（８）項記載の抗体とを同時あるいは連続的に反応させたのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することを特徴とする被検液中の上記（１）記載の蛋白質もしくは上記（２）記載の部分ペプチドまたはその塩の定量法などを提供する。

25

#### 図面の簡単な説明

図１は実施例１で得られた本発明のヒト脳由来蛋白質をコードするDNAの塩基配列（Z A Q C）、およびそれから推定されるアミノ酸配列を示す（図２

に続く)。

図2は実施例1で得られた本発明のヒト脳由来蛋白質をコードするDNAの塩基配列(ZAQC)、およびそれから推定されるアミノ酸配列を示す(図1の続き、図3に続く)。

- 5 図3は実施例1で得られた本発明のヒト脳由来蛋白質をコードするDNAの塩基配列(ZAQC)、およびそれから推定されるアミノ酸配列を示す(図2の続き)。

- 図4は実施例1で得られた本発明のヒト脳由来蛋白質をコードするDNAの塩基配列(ZAQT)、およびそれから推定されるアミノ酸配列を示す(図5  
10 に続く)。

図5は実施例1で得られた本発明のヒト脳由来蛋白質をコードするDNAの塩基配列(ZAQT)、およびそれから推定されるアミノ酸配列を示す(図4の続き、図6に続く)。

- 図6は実施例1で得られた本発明のヒト脳由来蛋白質をコードするDNAの塩基配列(ZAQT)、およびそれから推定されるアミノ酸配列を示す(図5  
15 の続き)。

図7は本発明のヒト脳由来蛋白質の疎水性プロットを示す。

図8は実施例2で行われたZAQの発現分布の解析結果を示す。

- 図9はMIT1、ヒト型ZAQリガンド前駆体ペプチド(Aタイプ)およびヒト  
20 型ZAQリガンド前駆体ペプチド(Gタイプ)のアミノ酸配列を示す。

図中、「MIT1」はMIT1のアミノ酸配列を、「Human(A type)」はヒト型ZAQリガンド成熟体ペプチド(Aタイプ)のアミノ酸配列を、「Human(B type)」はヒト型ZAQリガンド成熟体ペプチド(Bタイプ)のアミノ酸配列を、それぞれ示す。

- 25 図10は実施例6(6-3)で行われた、精製ZAQリガンドペプチドのZAQ活性化作用の測定結果を示す。

図11は実施例5(5-1)で用いたプラスミドpCAN618の制限酵素地図を示す。

発明の実施をするための最良の形態

本発明の蛋白質（G蛋白質共役型レセプター蛋白質）は、配列番号：1で表  
わされるアミノ酸配列（図1～図3または図4～図6中のアミノ酸配列）と同  
5 一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するレセプター蛋白質である  
（以下、本発明の蛋白質（G蛋白質共役型レセプター蛋白質）またはその塩を  
本発明の蛋白質と略記する場合がある）。

本発明の蛋白質（G蛋白質共役型レセプター蛋白質）は、例えば、ヒトや哺乳動物（例えば、モルモット、ラット、マウス、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、  
10 サルなど）のあらゆる細胞（例えば、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、膵臓β細胞、骨髄細胞、メサングウム細胞、ランゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、内皮細胞、繊維芽細胞、繊維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞（例、マクロファージ、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球）、巨核球、滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、  
15 破骨細胞、乳腺細胞、肝細胞もしくは間質細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もしくはガン細胞など）や血球系の細胞（例えば、MEL, M1, CTL-2, HT-2, WEHI-3, HL-60, JOSK-1, K562, ML-1, MOLT-3, MOLT-4, MOLT-10, CCRF-CEM, TALL-1, Jurkat, CCRT-HSB-2, KE-37, SKW-  
20 3, HUT-78, HUT-102, H9, U937, THP-1, HEL, JK-1, CMK, KO-812, MEG-01など）、またはそれらの細胞が存在するあらゆる組織、例えば、脳、脳の各部位（例、嗅球、扁桃核、大脳基底核、海馬、視床、視床下部、視床下核、大脳皮質、延髄、小脳、後頭葉、前頭葉、側頭葉、被殻、尾状核、脳幹、黒質）、脊髄、下垂体、胃、膵臓、腎  
25 臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髄、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管（例、大腸、小腸）、血管、心臓、胸腺、脾臓、顎下腺、末梢血、末梢血球、前立腺、睪丸、精巣、卵巣、胎盤、子宮、骨、関節、骨格筋など（特に、脳や脳の各部位）に由来する蛋白質であってもよく、また合成蛋白質であってもよい。

配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、例えば、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と約90%以上、好ましくは約95%以上、より好ましくは約98%以上の相同性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。

- 5 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有する蛋白質としては、例えば、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有し、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を有する蛋白質と実質的に同質の性質を有する蛋白質などが好ましい。

- 10 本発明の配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質としては、例えば、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有し、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と実質的に同質の活性を有する蛋白質などが好ましい。

- 15 実質的に同質の活性としては、例えば、リガンド結合活性、シグナル情報伝達作用などが挙げられる。実質的に同質とは、それらの活性が性質的に同質であることを示す。したがって、リガンド結合活性やシグナル情報伝達作用などの活性が同等（例、約0.5～2倍）であることが好ましいが、これらの活性の程度や蛋白質の分子量などの量的要素は異なってもよい。

- 20 リガンド結合活性やシグナル情報伝達作用などの活性の測定は、自体公知の方法に準じて行なうことができるが、例えば、決定方法やスクリーニング方法に従って測定することができる。

- 25 また、本発明の蛋白質としては、①配列番号：1で表わされるアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個（1または2個））のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、②配列番号：1で表わされるアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個（1または2個））のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、③配列番号：1で表わされるアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～30個

程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個(1または2個)のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または④それらを組み合わせたアミノ酸配列を含有する蛋白質なども用いられる。

本明細書における蛋白質は、ペプチド標記の慣例に従って左端がN末端(アミノ末端)、右端がC末端(カルボキシル末端)である。配列番号: 1で表わされるアミノ酸配列を含有する蛋白質をはじめとする本発明の蛋白質は、C末端が通常カルボキシル基( $-\text{COOH}$ )またはカルボキシレート( $-\text{COO}^-$ )であるが、C末端がアミド( $-\text{CONH}_2$ )またはエステル( $-\text{COOR}$ )であってもよい。

ここでエステルにおけるRとしては、例えば、メチル、エチル、*n*-プロピル、イソプロピルもしくは*n*-ブチルなどの $\text{C}_{1-6}$ アルキル基、例えば、シクロペンチル、シクロヘキシルなどの $\text{C}_{3-8}$ シクロアルキル基、例えば、フェニル、 $\alpha$ -ナフチルなどの $\text{C}_{6-12}$ アリール基、例えば、ベンジル、フェネチルなどのフェニル- $\text{C}_{1-2}$ アルキル基もしくは $\alpha$ -ナフチルメチルなどの $\alpha$ -ナフチル- $\text{C}_{1-2}$ アルキル基などの $\text{C}_{7-14}$ アラルキル基のほか、経口用エステルとして汎用されるピバロイルオキシメチル基などが用いられる。

本発明の蛋白質がC末端以外にカルボキシル基(またはカルボキシレート)を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化されているものも本発明の蛋白質に含まれる。この場合のエステルとしては、例えば上記したC末端のエステルなどが用いられる。

さらに、本発明の蛋白質には、上記した蛋白質において、N末端のメチオニン残基のアミノ基が保護基(例えば、ホルミル基、アセチル基などの $\text{C}_{2-6}$ アルカノイル基などの $\text{C}_{1-6}$ アシル基など)で保護されているもの、N端側が生体内で切断され生成したグルタミル基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基(例えば、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{SH}$ 、アミノ基、イミダゾール基、インドール基、グアニジノ基など)が適当な保護基(例えば、ホルミル基、アセチル基などの $\text{C}_{2-6}$ アルカノイル基などの $\text{C}_{1-6}$ アシル基など)で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖蛋白質などの複合蛋白

質なども含まれる。

本発明の蛋白質の具体例としては、例えば、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を含有するヒト由来（より好ましくはヒト脳由来）の蛋白質などがあげられる。

- 5     本発明の蛋白質の部分ペプチド（以下、部分ペプチドと略記する場合がある）としては、前記した本発明の蛋白質の部分ペプチドであれば何れのものであってもよいが、例えば、本発明の蛋白質分子のうち、細胞膜の外に露出している部位であって、レセプター結合活性を有するものなどが用いられる。

- 10     具体的には、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を有する蛋白質の部分ペプチドとしては、図7で示される疎水性プロット解析において細胞外領域（親水性（Hydrophilic）部位）であると分析された部分を含むペプチドである。また、疎水性（Hydrophobic）部位を一部を含むペプチドも同様に用いることができる。個々のドメインを個別に含むペプチドも用い得るが、複数のドメインを同時に含む部分のペプチドでも良い。

- 15     本発明の部分ペプチドのアミノ酸の数は、前記した本発明の蛋白質の構成アミノ酸配列のうち少なくとも20個以上、好ましくは50個以上、より好ましくは100個以上のアミノ酸配列を有するペプチドなどが好ましい。

- 20     実質的に同一のアミノ酸配列とは、これらアミノ酸配列と約50%以上、好ましくは約70%以上、より好ましくは約80%以上、さらに好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列を示す。

ここで、「実質的に同質の活性」とは、前記と同意義を示す。「実質的に同質の活性」の測定は前記と同様に行なうことができる。

- 25     また、本発明の部分ペプチドは、上記アミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～10個程度、さらに好ましくは数個（1または2個））のアミノ酸が欠失し、または、そのアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1～20個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個（1または2個））のアミノ酸が付加し、または、そのアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～10個程度、より好ましくは1～5個程度、さら

に好ましくは数個（1または2個）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されていてよい。

また、本発明の部分ペプチドはC末端が通常カルボキシル基（ $-\text{COOH}$ ）またはカルボキシレート（ $-\text{COO}^-$ ）であるが、前記した本発明の蛋白質のごとく、C末端がアミド（ $-\text{CONH}_2$ ）またはエステル（ $-\text{COOR}$ ）であ  
5 ってもよい。

さらに、本発明の部分ペプチドには、前記した本発明の蛋白質と同様に、N末端のメチオニン残基のアミノ基が保護基で保護されているもの、N端側が生体内で切断され生成したGlnがピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸  
10 の側鎖上の置換基が適当な保護基で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖ペプチドなどの複合ペプチドなども含まれる。

また、本発明の部分ペプチドはC末端が通常カルボキシル基（ $-\text{COOH}$ ）またはカルボキシレート（ $-\text{COO}^-$ ）であるが、前記した本発明の蛋白質のごとく、C末端がアミド（ $-\text{CONH}_2$ ）またはエステル（ $-\text{COOR}$ ）であ  
15 ってもよい。

本発明の蛋白質またはその部分ペプチドの塩としては、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、  
20 リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが用いられる。

本発明の蛋白質またはその塩は、前述したヒトや哺乳動物の細胞または組織から自体公知の蛋白質の精製方法によって製造することもできるし、後述する本発明の蛋白質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによ  
25 っても製造することができる。また、後述の蛋白質合成法またはこれに準じて製造することもできる。

ヒトや哺乳動物の組織または細胞から製造する場合、ヒトや哺乳動物の組織または細胞をホモジナイズした後、酸などで抽出を行ない、該抽出液を逆相ク



ロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーなどのクロマトグラフィーを組み合わせることにより精製単離することができる。

本発明の蛋白質、その部分ペプチドもしくはそれらの塩またはそれらのアミド体の合成には、通常市販の蛋白質合成用樹脂を用いることができる。そのような樹脂としては、例えば、クロロメチル樹脂、ヒドロキシメチル樹脂、ベンズヒドリルアミン樹脂、アミノメチル樹脂、4-ベンジルオキシベンジルアルコール樹脂、4-メチルベンズヒドリルアミン樹脂、PAM樹脂、4-ヒドロキシメチルメチルフェニルアセトアミドメチル樹脂、ポリアクリルアミド樹脂、4-(2',4'-ジメトキシフェニル-ヒドロキシメチル)フェノキシ樹脂、4-(2',4'-ジメトキシフェニル-Fmocアミノエチル)フェノキシ樹脂などを挙げることができる。このような樹脂を用い、 $\alpha$ -アミノ基と側鎖官能基を適当に保護したアミノ酸を、目的とする蛋白質の配列通りに、自体公知の各種縮合方法に従い、樹脂上で縮合させる。反応の最後に樹脂から蛋白質を切り出すと同時に各種保護基を除去し、さらに高希釈溶液中で分子内ジスルフィド結合形成反応を実施し、目的の蛋白質またはそれらのアミド体を取得する。

上記した保護アミノ酸の縮合に関しては、蛋白質合成に使用できる各種活性化試薬を用いることができるが、特に、カルボジイミド類がよい。カルボジイミド類としては、DCC、N,N'-ジイソプロピルカルボジイミド、N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロリル)カルボジイミドなどが用いられる。これらによる活性化にはラセミ化抑制添加剤（例えば、HOBt, HOOBt）とともに保護アミノ酸を直接樹脂に添加するかまたは、対称酸無水物またはHOBtエステルあるいはHOOBtエステルとしてあらかじめ保護アミノ酸の活性化を行なった後に樹脂に添加することができる。

保護アミノ酸の活性化や樹脂との縮合に用いられる溶媒としては、蛋白質縮合反応に使用しうることが知られている溶媒から適宜選択されうる。例えば、N,N-ジメチルホルムアミド、N,N-ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドンなどの酸アミド類、塩化メチレン、クロロホルムなどのハロゲン化炭化水素類、トリフルオロエタノールなどのアルコール類、ジメチルスルホキ

シドなどのスルホキシド類、ピリジン、ジオキサン、テトラヒドロフランなどのエーテル類、アセトニトリル、プロピオニトリルなどのニトリル類、酢酸メチル、酢酸エチルなどのエステル類あるいはこれらの適宜の混合物などが用いられる。反応温度は蛋白質結合形成反応に使用され得ることが知られている範囲から適宜選択され、通常約 $-20^{\circ}\text{C}$ ～ $50^{\circ}\text{C}$ の範囲から適宜選択される。活性化されたアミノ酸誘導体は通常1.5～4倍過剰で用いられる。ニンヒドリン反応を用いたテストの結果、縮合が不十分な場合には保護基の脱離を行うことなく縮合反応を繰り返すことにより十分な縮合を行なうことができる。反応を繰り返しても十分な縮合が得られないときには、無水酢酸またはアセチルイミ  
5  
10  
ダゾールを用いて未反応アミノ酸をアセチル化することができる。

原料のアミノ基の保護基としては、例えば、Z、Boc、ターシャリーペンチルオキシカルボニル、イソボルニルオキシカルボニル、4-メトキシベンジルオキシカルボニル、Cl-Z、Br-Z、アダマンチルオキシカルボニル、トリフルオロアセチル、フタロイル、ホルミル、2-ニトロフェニルスルフェニル、ジフェ  
15  
ニルホスフィノチオイル、Fmocなどが用いられる。

カルボキシル基は、例えば、アルキルエステル化（例えば、メチル、エチル、プロピル、ブチル、ターシャリーブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、シクロオクチル、2-アダマンチルなどの直鎖状、分枝状もしくは環状アルキルエステル化）、アラルキルエステル化（例えば、ベンジル  
20  
エステル、4-ニトロベンジルエステル、4-メトキシベンジルエステル、4-クロロベンジルエステル、ベンズヒドリルエステル化）、フェナシルエステル化、ベンジルオキシカルボニルヒドラジド化、ターシャリーブトキシカルボニルヒドラジド化、トリチルヒドラジド化などによって保護することができる。

セリンの水酸基は、例えば、エステル化またはエーテル化によって保護  
25  
ことができる。このエステル化に適する基としては、例えば、アセチル基などの低級アルカノイル基、ベンゾイル基などのアロイル基、ベンジルオキシカルボニル基、エトキシカルボニル基などの炭酸から誘導される基などが用いられる。また、エーテル化に適する基としては、例えば、ベンジル基、テトラヒド

ロピラニル基、t-ブチル基などである。

チロシンのフェノール性水酸基の保護基としては、例えば、Bzl、Cl<sub>2</sub>-Bzl、2-ニトロベンジル、Br-Z、ターシャリーブチルなどが用いられる。

ヒスチジンのイミダゾールの保護基としては、例えば、Tos、4-メトキシ-  
5 2,3,6-トリメチルベンゼンスルホニル、DNP、ベンジルオキシメチル、Bum、Boc、Trt、Fmocなどが用いられる。

原料のカルボキシル基の活性化されたものとしては、例えば、対応する酸無水物、アジド、活性エステル〔アルコール（例えば、ペンタクロロフェノール、2,4,5-トリクロロフェノール、2,4-ジニトロフェノール、シアノメチルアルコ  
10 ール、パラニトロフェノール、HONB、N-ヒドロキシスクシミド、N-ヒドロキシフタルイミド、HOBt）とのエステル〕などが用いられる。原料のアミノ基の活性化されたものとしては、例えば、対応するリン酸アミドが用いられる。

保護基の除去（脱離）方法としては、例えば、Pd-黒あるいはPd-炭素などの触媒の存在下での水素気流中での接触還元や、また、無水フッ化水素、メ  
15 タンスルホン酸、トリフルオロメタンスルホン酸、トリフルオロ酢酸あるいはこれらの混合液などによる酸処理や、ジイソプロピルエチルアミン、トリエチルアミン、ピペリジン、ピペラジンなどによる塩基処理、また液体アンモニア中ナトリウムによる還元なども用いられる。上記酸処理による脱離反応は、一般に約-20℃～40℃の温度で行なわれるが、酸処理においては、例えば、  
20 アニソール、フェノール、チオアニソール、メタクレゾール、パラクレゾール、ジメチルスルフィド、1,4-ブタンジチオール、1,2-エタンジチオールなどのようなカチオン捕捉剤の添加が有効である。また、ヒスチジンのイミダゾール保護基として用いられる2,4-ジニトロフェニル基はチオフェノール処理により除去され、トリプトファンのインドール保護基として用いられるホルミル基は上  
25 記の1,2-エタンジチオール、1,4-ブタンジチオールなどの存在下の酸処理による脱保護以外に、希水酸化ナトリウム溶液、希アンモニアなどによるアルカリ処理によっても除去される。

原料の反応に関与すべきでない官能基の保護ならびに保護基、およびその保

護基の脱離、反応に関与する官能基の活性化などは公知の基または公知の手段から適宜選択しうる。

蛋白質のアミド体を得る別の方法としては、例えば、まず、カルボキシ末端アミノ酸の $\alpha$ -カルボキシル基をアミド化して保護した後、アミノ基側にペプチド鎖を所望の鎖長まで延ばした後、該ペプチド鎖のN末端の $\alpha$ -アミノ基の保護基のみを除いた蛋白質とC末端のカルボキシル基の保護基のみを除去した蛋白質とを製造し、この両蛋白質を上記したような混合溶媒中で縮合させる。縮合反応の詳細については上記と同様である。縮合により得られた保護蛋白質を精製した後、上記方法によりすべての保護基を除去し、所望の粗蛋白質を得ることができる。この粗蛋白質は既知の各種精製手段を駆使して精製し、主要画分を凍結乾燥することで所望の蛋白質のアミド体を得ることができる。

蛋白質のエステル体を得るには、例えば、カルボキシ末端アミノ酸の $\alpha$ -カルボキシル基を所望のアルコール類と縮合しアミノ酸エステルとした後、蛋白質のアミド体と同様にして、所望の蛋白質のエステル体を得ることができる。

本発明の蛋白質の部分ペプチドまたはその塩は、自体公知のペプチドの合成法に従って、あるいは本発明の蛋白質を適当なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。ペプチドの合成法としては、例えば、固相合成法、液相合成法のいずれによっても良い。すなわち、本発明の蛋白質を構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分とを縮合させ、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目的のペプチドを製造することができる。公知の縮合方法や保護基の脱離としては、例えば、以下の①～⑤に記載された方法が挙げられる。

- ①M. Bodanszky および M. A. Ondetti、ペプチド シンセシス (Peptide Synthesis), Interscience Publishers, New York (1966年)
- ②SchroederおよびLuebke、ザ ペプチド(The Peptide), Academic Press, New York (1965年)
- ③泉屋信夫他、ペプチド合成の基礎と実験、丸善(株) (1975年)
- ④矢島治明 および榊原俊平、生化学実験講座 1、蛋白質の化学IV、205、(1977

年)

⑤矢島治明監修、続医薬品の開発 第14巻 ペプチド合成 広川書店

また、反応後は通常の精製法、たとえば、溶媒抽出・蒸留・カラムクロマトグラフィー・液体クロマトグラフィー・再結晶などを組み合わせて本発明の部分ペプチドを精製単離することができる。上記方法で得られる部分ペプチドが遊離体である場合は、公知の方法によって適当な塩に変換することができるし、逆に塩で得られた場合は、公知の方法によって遊離体に変換することができる。

本発明の蛋白質をコードするDNAとしては、前述した本発明の蛋白質をコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、前記した細胞・組織由来のcDNA、前記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、前記した細胞・組織よりtotal RNAまたはmRNA画分を調製したものをを用いて直接Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (以下、RT-PCR法と略称する)によって増幅することもできる。

具体的には、本発明の蛋白質をコードするDNAとしては、例えば、配列番号：2または配列番号：3で表わされる塩基配列を含有するDNA、または配列番号：2または配列番号：3で表わされる塩基配列を有するDNAとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAを有し、本発明の蛋白質と実質的に同質の活性（例、リガンド結合活性、シグナル情報伝達作用など）を有する蛋白質をコードするDNAであれば何れのものでもよい。

配列番号：2または配列番号：3で表わされる塩基配列を有するDNAとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAとしては、例えば、配列番号：2または配列番号：3で表わされる塩基配列と約90%以上、好ましくは約95%以上、より好ましくは約98%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

ハイブリダイゼーションは、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法、例

例えば、モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning) 2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。より好ましくは、ハイストリン

5 ジェントな条件に従って行なうことができる。  
ハイストリンジェントな条件とは、例えば、ナトリウム濃度が約19~40 mM、好ましくは約19~20 mMで、温度が約50~70℃、好ましくは約60~65℃の条件を示す。特に、ナトリウム濃度が約19 mMで温度が約65℃の場合が最も好ましい。

10 より具体的には、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を有する蛋白質をコードするDNAとしては、配列番号：2または配列番号：3で表わされる塩基配列を有するDNAがあげられる。

本発明の蛋白質をコードする塩基配列を含有する、または該塩基配列と相補的な塩基配列の一部を含有してなるヌクレオチド (オリゴヌクレオチド) とは、  
15 本発明の蛋白質またはその部分ペプチドをコードするDNAを包含するだけでなく、RNAをも包含する意味で用いられる。

本発明に従えば、本発明の蛋白質遺伝子の複製又は発現を阻害することのできるアンチセンス・ (オリゴ) ヌクレオチド (核酸) を、クローン化したあるいは決定された蛋白質をコードする塩基配列の塩基配列情報に基づき設計し、  
20 合成しうる。そうした (オリゴ) ヌクレオチド (核酸) は、G蛋白質共役型蛋白質遺伝子のRNAとハイブリダイズすることができ、該RNAの合成又は機能を阻害することができるか、あるいはG蛋白質共役型蛋白質関連RNAとの相互作用を介してG蛋白質共役型蛋白質遺伝子の発現を調節・制御することができる。G蛋白質共役型蛋白質関連RNAの選択された配列に相補的な (オリ

25 ゴ) ヌクレオチド、及びG蛋白質共役型蛋白質関連RNAと特異的にハイブリダイズすることができる (オリゴ) ヌクレオチドは、生体内及び生体外でG蛋白質共役型蛋白質遺伝子の発現を調節・制御するのに有用であり、また病気などの治療又は診断に有用である。

用語「対応する」とは、遺伝子を含めたヌクレオチド、塩基配列又は核酸の特定の配列に相同性を有するあるいは相補的であることを意味する。ヌクレオチド、塩基配列又は核酸とペプチド（蛋白質）との間で「対応する」とは、ヌクレオチド（核酸）の配列又はその相補体から誘導される指令にあるペプチド（蛋白質）のアミノ酸を通常指している。G蛋白質共役型蛋白質遺伝子の5'端ヘアピンループ、5'端6-ベースペア・リピート、5'端非翻訳領域、ポリペプチド翻訳開始コドン、蛋白質コード領域、ORF翻訳開始コドン、3'端非翻訳領域、3'端パリンドローム領域、及び3'端ヘアピンループは好ましい対象領域として選択しうるが、G蛋白質共役型蛋白質遺伝子内の如何なる領域も対象として選択しうる。

目的核酸と、対象領域の少なくとも一部に相補的な（オリゴ）ヌクレオチドとの関係は、対象物とハイブリダイズすることができる（オリゴ）ヌクレオチドとの関係は、「アンチセンス」であることができる。アンチセンス・（オリゴ）ヌクレオチドは、2-デオキシ-D-リボースを含有しているポリデオキシヌクレオチド、D-リボースを含有しているポリデオキシヌクレオチド、プリン又はピリミジン塩基のN-グリコシドであるその他のタイプのポリヌクレオチド、あるいは非ヌクレオチド骨格を有するその他のポリマー（例えば、市販の蛋白質核酸及び合成配列特異的な核酸ポリマー）又は特殊な結合を含有するその他のポリマー（但し、該ポリマーはDNAやRNA中に見出されるような塩基のペアリナグや塩基の付着を許容する配置をもつヌクレオチドを含有する）などが挙げられる。それらは、2本鎖DNA、1本鎖DNA、2本鎖RNA、1本鎖RNA、さらにDNA:RNAハイブリッドであることができ、さらに非修飾ポリヌクレオチド又は非修飾オリゴヌクレオチド、さらには公知の修飾の付加されたもの、例えば当該分野で知られた標識のあるもの、キヤップの付いたもの、メチル化されたもの、1個以上の天然のヌクレオチドを類縁物で置換したもの、分子内ヌクレオチド修飾のされたもの、例えば非荷電結合（例えば、メチルホスホネート、ホスホトリエステル、ホスホルアミデート、カルバメートなど）を持つもの、電荷を有する結合又は硫黄含有結合（例

例えば、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエートなど）を持つもの、例えば蛋白質（ヌクレアーゼ、ヌクレアーゼ・インヒビター、トキシン、抗体、シグナルペプチド、ポリーラーリジンなど）や糖（例えば、モノサッカライドなど）などの側鎖基を有しているもの、インターカレント化合物（例えば、アクリジン、  
5 プソラレンなど）を持つもの、キレート化合物（例えば、金属、放射活性をもつ金属、ホウ素、酸化性の金属など）を含有するもの、アルキル化剤を含有するもの、修飾された結合を持つもの（例えば、 $\alpha$ アノマー型の核酸など）であってもよい。ここで「ヌクレオシド」、「ヌクレオチド」及び「核酸」とは、プリン及びピリミジン塩基を含有するのみでなく、修飾されたその他の複  
10 素環型塩基をもつようなものを含んでいて良い。こうした修飾物は、メチル化されたプリン及びピリミジン、アシル化されたプリン及びピリミジン、あるいはその他の複素環を含むものであってよい。修飾されたヌクレオチド及び修飾されたヌクレオチドはまた糖部分が修飾されていてよく、例えば1個以上の水酸基がハロゲンとか、脂肪族基などで置換されていたり、あるいはエーテル、  
15 アミンなどの官能基に変換されていてよい。

本発明のアンチセンス核酸は、RNA、DNA、あるいは修飾された核酸である。修飾された核酸の具体例としては核酸の硫黄誘導体やチオホスフェート誘導体、そしてポリヌクレオシドアミドやオリゴヌクレオシドアミドの分解に抵抗性のものが挙げられるが、それに限定されるものではない。本発明のアン  
20 チセンス核酸は次のような方針で好ましく設計されうる。すなわち、細胞内でのアンチセンス核酸をより安定なものにする、アンチセンス核酸の細胞透過性をより高める、目標とするセンス鎖に対する親和性をより大きなものにする、そしてもし毒性があるならアンチセンス核酸の毒性をより小さなものにする。

こうして修飾は当該分野で数多く知られており、例えば J. Kawakami et al.,  
25 Pharm Tech Japan, Vol. 8, pp. 247, 1992; Vol. 8, pp. 395, 1992; S. T. Crooke et al. ed., Antisense Research and Applications, CRC Press, 1993 などに開示がある。

本発明のアンチセンス核酸は、変化せしめられたり、修飾された糖、塩基、



結合を含有していて良く、リポソーム、ミクロスフェアのような特殊な形態で  
供与されたり、遺伝子治療により適用されたり、付加された形態で与えられる  
ことができる。こうして付加形態で用いられるものとしては、リン酸基骨格  
の電荷を中和するように働くポリリジンのようなポリカチオン体、細胞膜との  
5 相互作用を高めたり、核酸の取込みを増大せしめるような脂質（例えば、ホス  
ホリピッド、コレステロールなど）といった粗水性のものが挙げられる。付加  
するに好ましい脂質としては、コレステロールやその誘導体（例えば、コレス  
テリルクロロホルメート、コール酸など）が挙げられる。こうしたものは、核  
酸の3'端あるいは5'端に付着させることができ、塩基、糖、分子内ヌクレ  
10 オシド結合を介して付着させることができる。その他の基としては、核酸の  
3'端あるいは5'端に特異的に配置されたキャップ用の基で、エキソヌクレ  
アーゼ、RNaseなどのヌクレアーゼによる分解を阻止するためのものが挙  
げられる。こうしたキャップ用の基としては、ポリエチレングリコール、テト  
ラエチレングリコールなどのグリコールをはじめとした当該分野で知られた水  
15 酸基の保護基が挙げられるが、それに限定されるものではない。

アンチセンス核酸の阻害活性は、本発明の形質転換体、本発明の生体内や生  
体外の遺伝子発現系、あるいは蛋白質の生体内や生体外の翻訳系を用いて調べ  
ることができる。該核酸其れ自体公知の各種の方法で細胞に適用できる。

本発明の部分ペプチドをコードするDNAとしては、前述した本発明の部分  
20 ペプチドをコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであつて  
もよい。また、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、前記した細胞・組  
織由来のcDNA、前記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成D  
NAのいずれでもよい。ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファ  
ージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、  
25 前記した細胞・組織よりmRNA画分を調製したものをを用いて直接Reverse  
Transcriptase Polymerase Chain Reaction（以下、RT-PCR法と略称する）  
によって増幅することもできる。

具体的には、本発明の部分ペプチドをコードするDNAとしては、例えば、

配列番号：2または配列番号：3で表わされる塩基配列を有するDNAの部分塩基配列を有するDNA、または②配列番号：2または配列番号：3で表わされる塩基配列を有するDNAとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAを有し、本発明の蛋白質ペプチドと実質的に同質の活性（例、リ  
5 ガンド結合活性、シグナル情報伝達作用など）を有する蛋白質をコードするDNAの部分塩基配列を有するDNAなどが用いられる。

配列番号：2または配列番号：3で表わされる塩基配列を有するDNAとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAとしては、例えば、配列番号：2または配列番号：3で表わされる塩基配列と約90%以上、好ま  
10 しくは約95%以上、より好ましくは約98%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

本発明の蛋白質またはその部分ペプチド（以下、本発明の蛋白質と略記する）を完全にコードするDNAのクローニングの手段としては、本発明の蛋白質をコードするDNAの塩基配列の部分塩基配列を有する合成DNAプライマーを  
15 用いてPCR法によって増幅するか、または適当なベクターに組み込んだDNAを本発明の蛋白質の一部あるいは全領域をコードするDNA断片もしくは合成DNAを用いて標識したものとのハイブリダイゼーションによって選別することができる。ハイブリダイゼーションの方法は、例えば、モレキュラー・クローニング（Molecular Cloning）2nd（J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor  
20 Lab. Press, 1989）に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。

DNAの塩基配列の変換は、PCRや公知のキット、例えば、Mutan<sup>TM</sup>-super Express Km（宝酒造（株））、Mutan<sup>TM</sup>-K（宝酒造（株））等を用いて、ODA-LA  
25 PCR法やGapped duplex法やKunkel法等の自体公知の方法あるいはそれらに準じる方法に従って行なうことができる。

クローン化された蛋白質をコードするDNAは目的によりそのまま、または所望により制限酵素で消化したり、リンカーを付加したりして使用することが

できる。該DNAはその5'末端側に翻訳開始コドンとしてのATGを有し、また3'末端側には翻訳終止コドンとしてのTAA、TGAまたはTAGを有していてもよい。これらの翻訳開始コドンや翻訳終止コドンは、適当な合成DNAアダプターを用いて付加することもできる。

- 5 本発明の蛋白質の発現ベクターは、例えば、(イ)本発明の蛋白質をコードするDNAから目的とするDNA断片を切り出し、(ロ)該DNA断片を適当な発現ベクター中のプロモーターの下流に連結することにより製造することができる。

ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド(例、pBR322, pBR3  
10 25, pUC12, pUC13)、枯草菌由来のプラスミド(例、pUB110, pTP5, pC194)、酵母由来プラスミド(例、pSH19, pSH15)、 $\lambda$ ファージなどのバクテリオファージ、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、バキュロウイルスなどの動物ウイルスなどの他、pA1-11, pXT1, pRc/CMV, pRc/RSV, pcDNA1/Neo, pcDN  
15 A3.1, pRc/CMV2, pRc/RSV (Invitrogen社)などが用いられる。

本発明で用いられるプロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。例えば、動物細胞を宿主として用いる場合は、SR $\alpha$ プロモーター、SV40プロモーター、H  
20 IV-LTRプロモーター、CMVプロモーター、HSV-TKプロモーターなどが挙げられる。

これらのうち、CMVプロモーター、SR $\alpha$ プロモーターなどを用いるのが好ましい。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、trpプロモーター、lac  
cプロモーター、recAプロモーター、 $\lambda$ P<sub>L</sub>プロモーター、lppプロモ  
25 ーターなどが、宿主がバチルス属菌である場合は、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーターなど、宿主が酵母である場合は、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーターなどが好ましい。宿主が昆虫細胞である場合は、ポリヘドリンプロ

モーター、P10プロモーターなどが好ましい。

発現ベクターには、以上の他に、所望によりエンハンサー、スプライシング  
シグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、SV40複製オリジン（以下、  
SV40oriと略称する場合がある）などを含有しているものを用いること  
5 ができる。選択マーカーとしては、例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素（以下、d  
hfrと略称する場合がある）遺伝子〔メソトレキセート（MTX）耐性〕、  
アンピシリン耐性遺伝子（以下、Amp<sup>r</sup>と略称する場合がある）、ネオマイ  
シン耐性遺伝子（以下、Neo<sup>r</sup>と略称する場合がある、G418耐性）等が  
挙げられる。特に、CHO（dhfr<sup>-</sup>）細胞を用いてdhfr遺伝子を選択  
10 マーカーとして使用する場合、目的遺伝子をチミジンを含まない培地によっ  
ても選択できる。

また、必要に応じて、宿主に合ったシグナル配列を、本発明の蛋白質のN端  
末側に付加する。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、PhoA・シグナル配列、  
OmpA・シグナル配列などが、宿主がバチルス属菌である場合は、 $\alpha$ -アミラー  
15 ゼ・シグナル配列、サブチリシン・シグナル配列などが、宿主が酵母である場  
合は、MF $\alpha$ ・シグナル配列、SUC2・シグナル配列など、宿主が動物細胞  
である場合には、インシュリン・シグナル配列、 $\alpha$ -インターフェロン・シグ  
ナル配列、抗体分子・シグナル配列などがそれぞれ利用できる。

このようにして構築された本発明の蛋白質をコードするDNAを含有するベ  
20 クターを用いて、形質転換体を製造することができる。

宿主としては、例えば、エシェリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、昆虫細胞、  
昆虫、動物細胞などが用いられる。

エシェリヒア属菌の具体例としては、エシェリヒア・コリ (Escherichia coli)  
K12・DH1〔プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ  
25 ブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. US  
A), 60巻, 160(1968)], JM103〔ヌクレック・アシズ・  
リサーチ, (Nucleic Acids Research), 9巻, 309(1981)], JA2  
21〔ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (Journal of Molecular

Biology) ], 120巻, 517(1978)], HB101 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー, 41巻, 459(1969)], C600 [ジェネティックス (Genetics), 39巻, 440(1954)] などが用いられる。

パチルス属菌としては、例えば、パチルス・サチルス (*Bacillus subtilis*)  
5 MI114 [ジーン, 24巻, 255(1983)], 207-21 [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (*Journal of Biochemistry*), 95巻, 87(1984)] などが用いられる。

酵母としては、例えば、サッカロマイセス セレビスイエ (*Saccharomyces cerevisiae*) AH22, AH22R<sup>-</sup>, NA87-11A, DKD-5D, 2  
10 0B-12, シゾサッカロマイセス ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*) NCYC1913, NCYC2036、ピキア パストリス (*Pichia pastoris*) などが用いられる。

昆虫細胞としては、例えば、ウイルスがAcNPVの場合は、夜盗蛾の幼虫由来株化細胞 (*Spodoptera frugiperda* cell; Sf細胞)、*Trichoplusia ni*  
15 の中腸由来のMG1細胞、*Trichoplusia ni*の卵由来のHigh Five<sup>TM</sup>細胞、*Mamestra brassicae*由来の細胞または*Estigmene acrea*由来の細胞などが用いられる。ウイルスがBmNPVの場合は、蚕由来株化細胞 (*Bombyx mori* N; BmN細胞) などが用いられる。該Sf細胞としては、例えば、Sf9細胞 (ATCC CRL1711)、Sf21細胞 (以上、Vaughn, J.L. ら、イン・ヴィボ (In Vivo), 13,  
20 213-217, (1977)) などが用いられる。

昆虫としては、例えば、カイコの幼虫などが用いられる [前田ら、ネイチャー (Nature), 315巻, 592(1985)]。

動物細胞としては、例えば、サル細胞COS-7, Vero, チャイニーズハムスター細胞CHO (以下、CHO細胞と略記), dhfr遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞CHO (以下、CHO (dhfr<sup>-</sup>) 細胞と略記), マウスL細胞, マウスAtT-20, マウスミエローマ細胞, ラットGH3, ヒトFL細胞などが用いられる。

エシェリヒア属菌を形質転換するには、例えば、プロシージングズ・オブ・

ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 69巻, 2110(1972)やジーン (Gene), 17巻, 107(1982)などに記載の方法に従って行なうことができる。バチルス属菌を形質転換するには、例えば、モレキュラー・アンド・ジェネラル・ジェネティックス (Molecular & General Genetics), 168巻, 111(1979)などに記載の方法に従って行なうことができる。

酵母を形質転換するには、例えば、メソズ・イン・エンザイモロジー (Methods in Enzymology), 194巻, 182-187(1991)、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 75巻, 1929(1978)などに記載の方法に従って行なうことができる。

昆虫細胞または昆虫を形質転換するには、例えば、バイオ／テクノロジー (Bio/Technology), 6, 47-55(1988)などに記載の方法に従って行なうことができる。

15 動物細胞を形質転換するには、例えば、細胞工学別冊8 新 細胞工学実験プロトコル, 263-267(1995)(秀潤社発行)、ヴィロロジー (Virology), 52巻, 456(1973)に記載の方法に従って行なうことができる。

このようにして、G蛋白質共役型蛋白質をコードするDNAを含有する発現ベクターで形質転換された形質転換体を得られる。

宿主がエシェリヒア属菌、バチルス属菌である形質転換体を培養する際、培養に使用される培地としては液体培地が適当であり、その中には該形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物その他が含有せしめられる。炭素源としては、例えば、グルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖など、窒素源としては、例えば、アンモニウム塩類、硝酸塩類、コーンスチープ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などの無機または有機物質、無機物としては、例えば、塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウムなどが挙げられる。また、酵母エキス、ビタミン類、生

長促進因子などを添加してもよい。培地のpHは約5～8が望ましい。

エシェリヒア属菌を培養する際の培地としては、例えば、グルコース、カザミノ酸を含むM9培地〔ミラー (Miller) , ジャーナル・オブ・エクスペリメンツ・イン・モレキュラー・ジェネティックス (Journal of Experiments in Molecular Genetics) , 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1972〕が好ましい。ここに必要によりプロモーターを効率よく働かせるために、例えば、3 $\beta$ -インドリル アクリル酸のような薬剤を加えることができる。宿主がエシェリヒア属菌の場合、培養は通常約15～43℃で約3～24時間行ない、必要により、通気や攪拌を加えることもできる。

10 宿主がバチルス属菌の場合、培養は通常約30～40℃で約6～24時間行ない、必要により通気や攪拌を加えることもできる。

宿主が酵母である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、バークホルダー (Burkholder) 最小培地〔Bostian, K. L. ら、「プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) , 77巻, 4505 (1980)〕や0.5%カザミノ酸を含有するSD培地〔Bitter, G. A. ら、「プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) , 81巻, 5330 (1984)〕が挙げられる。培地のpHは約5～8に調整するのが好ましい。培養は  
20 通常約20℃～35℃で約24～72時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

宿主が昆虫細胞または昆虫である形質転換体を培養する際、培地としては、Grace's Insect Medium (Grace, T. C. C., ネイチャー (Nature) , 195, 788 (1962)) に非動化した10%ウシ血清等の添加物を適宜加えたものなどが用いられる。  
25 培地のpHは約6.2～6.4に調整するのが好ましい。培養は通常約27℃で約3～5日間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、約5～20%の胎児牛血清を含むMEM培地〔サイエンス (Science) , 122巻,

501(1952)], DMEM培地〔ヴィロロジー (Virology), 8巻, 396(1959)], RPMI 1640培地〔ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・メディカル・アソシエーション (The Journal of the American Medical Association) 199巻, 519(1967)], 199培地〔プロシーディング・オブ・ザ・ソサイエティ・フォー・ザ・バイオロジカル・メディシン (Proceeding of the Society for the Biological Medicine), 73巻, 1(1950)]などが用いられる。pHは約6～8であるのが好ましい。培養は通常約30℃～40℃で約15～60時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

10 以上のようにして、形質転換体の細胞内、細胞膜または細胞外に本発明のG蛋白質共役型蛋白質を生成せしめることができる。

上記培養物から本発明の蛋白質を分離精製するには、例えば、下記の方法により行なうことができる。

本発明の蛋白質を培養菌体あるいは細胞から抽出するに際しては、培養後、公知の方法で菌体あるいは細胞を集め、これを適当な緩衝液に懸濁し、超音波、  
15 リゾチームおよび/または凍結融解などによって菌体あるいは細胞を破壊したのち、遠心分離やろ過により蛋白質の粗抽出液を得る方法などが適宜用いられる。緩衝液の中に尿素や塩酸グアニジンなどの蛋白質変性剤や、トリトンX-100™などの界面活性剤が含まれていてもよい。培養液中に蛋白質が分泌される場合には、培養終了後、それ自体公知の方法で菌体あるいは細胞と上清と  
20 を分離し、上清を集める。

このようにして得られた培養上清、あるいは抽出液中に含まれる蛋白質の精製は、自体公知の分離・精製法を適切に組み合わせて行なうことができる。これらの公知の分離、精製法としては、塩析や溶媒沈澱法などの溶解度を利用する方法、透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、およびSDS-ポリアクリルアミ  
25 ドゲル電気泳動法などの主として分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動法などの等電点の差を利用



する方法などが用いられる。

- かくして得られる蛋白質が遊離体で得られた場合には、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法によって塩に変換することができ、逆に塩で得られた場合には自体公知の方法あるいはそれに準じる方法により、遊離体または他の塩
- 5 に変換することができる。

- なお、組換え体が産生する蛋白質を、精製前または精製後に適当な蛋白修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり、ポリペプチドを部分的に除去することもできる。蛋白修飾酵素としては、例えば、トリプシン、キモトリプシン、アルギニルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グリコシ
- 10 ダーゼなどが用いられる。

かくして生成する本発明の蛋白質またはその塩の活性は、標識したリガンドとの結合実験および特異抗体を用いたエンザイムイムノアッセイなどにより測定することができる。

- 本発明の蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらの塩に対する抗体は、本発
- 15 明の蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらの塩を認識し得る抗体であれば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体の何れであってもよい。

本発明の蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらの塩（以下、本発明の蛋白質等と略記する）に対する抗体は、本発明の蛋白質等を抗原として用い、自体公知の抗体または抗血清の製造法に従って製造することができる。

- 20 [モノクローナル抗体の作製]

(a) モノクローナル抗体産生細胞の作製

- 本発明の蛋白質等は、哺乳動物に対して投与により抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバント
- 25 を投与してもよい。投与は通常2～6週毎に1回ずつ、計2～10回程度行なわれる。用いられる哺乳動物としては、例えば、サル、ウサギ、イヌ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギが挙げられるが、マウスおよびラットが好ましく用いられる。

モノクローナル抗体産生細胞の作製に際しては、抗原を免疫された温血動物、例えば、マウスから抗体価の認められた個体を選択し最終免疫の2～5日後に脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を骨髓腫細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製することができる。抗血清中の抗体価の測定は、例えば、後記の標識化した本発明の蛋白質等と抗血清とを反応させたのち、抗体に結合した標識剤の活性を測定することにより行なうことができる。融合操作は既知の方法、例えば、ケーラーとミルスタインの方法〔ネイチャー (Nature)、256巻、495頁(1975年)〕に従い実施することができる。融合促進剤としては、例えば、ポリエチレングリコール (PEG) やセンダイウィルスなどが挙げられるが、好ましくはPEGが用いられる。

骨髓腫細胞としては、例えば、NS-1、P3U1、SP2/0などが挙げられるが、P3U1が好ましく用いられる。用いられる抗体産生細胞（脾臓細胞）数と骨髓腫細胞数との好ましい比率は1:1～20:1程度であり、PEG（好ましくは、PEG1000～PEG6000）が10～80%程度の濃度で添加され、約20～40℃、好ましくは約30～37℃で約1～10分間インキュベートすることにより効率よく細胞融合を実施できる。

モノクローナル抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングには種々の方法が使用できるが、例えば、本発明の蛋白質等抗原を直接あるいは担体とともに吸着させた固相（例、マイクロプレート）にハイブリドーマ培養上清を添加し、次に放射性物質や酵素などで標識した抗免疫グロブリン抗体（細胞融合に用いられる細胞がマウスの場合、抗マウス免疫グロブリン抗体が用いられる）またはプロテインAを加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法、抗免疫グロブリン抗体またはプロテインAを吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添加し、放射性物質や酵素などで標識した本発明の蛋白質等を加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法などが挙げられる。

モノクローナル抗体の選別は、自体公知あるいはそれに準じる方法に従って行なうことができるが、通常はHAT（ヒポキサンチン、アミノプテリン、チ

ミジン)を添加した動物細胞用培地などで行なうことができる。選別および育種用培地としては、ハイブリドーマが生育できるものならばどのような培地を用いても良い。例えば、1~20%、好ましくは10~20%の牛胎児血清を含むRPMI 1640培地、1~10%の牛胎児血清を含むGIT培地(和光純薬工業(株))またはハイブリドーマ培養用無血清培地(SFM-101、  
5 日水製薬(株))などを用いることができる。培養温度は、通常20~40℃、好ましくは約37℃である。培養時間は、通常5日~3週間、好ましくは1週間~2週間である。培養は、通常5%炭酸ガス下で行なうことができる。ハイブリドーマ培養上清の抗体価は、上記の抗血清中の抗体価の測定と同様にして  
10 測定できる。

#### (b) モノクローナル抗体の精製

モノクローナル抗体の分離精製は、通常のポリクローナル抗体の分離精製と同様に免疫グロブリンの分離精製法〔例、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、イオン交換体(例、DEAE)による吸脱着法、超遠心  
15 法、ゲルろ過法、抗原結合固相またはプロテインAあるいはプロテインGなどの活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法〕に従って行なうことができる。

#### 〔ポリクローナル抗体の作製〕

本発明のポリクローナル抗体は、それ自体公知あるいはそれに準じる方法にしたがって製造することができる。例えば、免疫抗原(本発明の蛋白質等の抗原)とキャリアー蛋白質との複合体をつくり、上記のモノクローナル抗体の製造法と同様に哺乳動物に免疫を行ない、該免疫動物から本発明の蛋白質等に対する抗体含有物を採取して、抗体の分離精製を行なうことにより製造できる。  
20

哺乳動物を免疫するために用いられる免疫抗原とキャリアー蛋白質との複合体に関し、キャリアー蛋白質の種類およびキャリアーとハプテンとの混合比は、  
25 体に関し、キャリアー蛋白質の種類およびキャリアーとハプテンとの混合比は、キャリアーに架橋させて免疫したハプテンに対して抗体が効率良くできれば、どのようなものをどのような比率で架橋させてもよいが、例えば、ウシ血清アルブミン、ウシサイログロブリン、キーホール・リンペット・ヘモシアニン等を重

量比でハプテン 1 に対し、約 0.1 ～ 20、好ましくは約 1 ～ 5 の割合でカプルさせる方法が用いられる。

また、ハプテンとキャリアーのカプリングには、種々の縮合剤を用いることができるが、グルタルアルデヒドやカルボジイミド、マレイミド活性エステル、  
5 チオール基、ジチオビリジル基を含有する活性エステル試薬等が用いられる。

縮合生成物は、温血動物に対して、抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は、通常約 2 ～ 6 週毎に 1 回ずつ、計約 3 ～ 10 回程度行なうことが  
10 できる。

ポリクローナル抗体は、上記の方法で免疫された哺乳動物の血液、腹水など、好ましくは血液から採取することができる。

抗血清中のポリクローナル抗体価の測定は、上記の血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。ポリクローナル抗体の分離精製は、上記のモノクロー  
15 ナル抗体の分離精製と同様の免疫グロブリンの分離精製法に従って行なうことができる。

本発明の蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらの塩、およびそれらをコードする DNA は、①本発明の蛋白質に対するリガンドの決定方法、②抗体および抗血清の入手、③組換え型蛋白質の発現系の構築、④同発現系を用いたレセ  
20 プター結合アッセイ系の開発と医薬品候補化合物のスクリーニング、⑤構造的に類似したリガンド・レセプターとの比較にもとづいたドラッグデザインの実施、⑥遺伝子診断におけるプローブや PCR プライマーを作成するための試薬、⑦トランスジェニック動物の作製または⑧遺伝子予防・治療剤等の医薬などとして用いることができる。  
25

特に、本発明の組換え型蛋白質の発現系を用いたレセプター結合アッセイ系を用いることによって、ヒトや哺乳動物に特異的な G 蛋白質共役型レセプターに対するリガンドの結合性を変化させる化合物（例、アゴニスト、アンタゴニ

ストなど) をスクリーニングすることができ、該アゴニストまたはアンタゴニストを各種疾病の予防・治療剤などとして使用することができる。

本発明の蛋白質、部分ペプチドまたはそれらの塩(以下、本発明の蛋白質等と略記する場合がある)、本発明の蛋白質またはその部分ペプチドをコードするDNA(以下、本発明のDNAと略記する場合がある)および本発明の蛋白質等に対する抗体(以下、本発明の抗体と略記する場合がある)の用途について、以下に具体的に記載する。

#### (1) 本発明の蛋白質に対するリガンド(アゴニスト)の決定方法

本発明の蛋白質もしくはその塩または本発明の部分ペプチドもしくはその塩は、本発明の蛋白質またはその塩に対するリガンド(アゴニスト)を探索し、または決定するための試薬として有用である。

すなわち、本発明は、本発明の蛋白質もしくはその塩または本発明の部分ペプチドもしくはその塩と、試験化合物とを接触させることを特徴とする本発明の蛋白質に対するリガンドの決定方法を提供する。

試験化合物としては、公知のリガンド(例えば、アンギオテンシン、ボンベシン、カナビノイド、コレシストキニン、グルタミン、セロトニン、メラトニン、ニューロペプチドY、オピオイド、プリン、バソプレッシン、オキシトシン、PACAP、セクレチン、グルカゴン、カルシトニン、アドレノメジュリン、ソマトスタチン、GHRH、CRF、ACTH、GRP、PTH、VIP(バソアクティブ インテスティナル アンド リレイテッド ポリペプチド)、ソマトスタチン、ドーパミン、モチリン、アミリン、ブラジキニン、CGRP(カルシトニンジーンリレーティッドペプチド)、ロイコトリエン、パンクレアスタチン、プロスタグランジン、トロンボキサン、アデノシン、アドレナリン、 $\alpha$ および $\beta$ -ケモカイン(chemokine)(例えば、IL-8、GRO $\alpha$ 、GRO $\beta$ 、GRO $\gamma$ 、NAP-2、ENA-78、PF4、IP10、GCP-2、MCP-1、HC14、MCP-3、I-309、MIP1 $\alpha$ 、MIP-1 $\beta$ 、RANTESなど)、エンドセリン、エンテログストリン、ヒスタミン、ニューロテンシン、TRH、パンクレアティックポリペプチド、ガ

ラニン、MITIまたはその哺乳動物のホモログなどがあげられ、またその他に、例えば、ヒトまたは哺乳動物（例えば、マウス、ラット、ブタ、ウシ、ヒツジ、サルなど）の組織抽出物、細胞培養上清などが用いられる。例えば、該組織抽出物、細胞培養上清などを本発明の蛋白質に添加し、細胞刺激活性などを測定しながら分画し、最終的に単一のリガンドを得ることができる。

リガンドがペプチド性リガンドである場合、該リガンドをリガンドペプチドと称することがある。また、リガンドペプチドが前駆体として発現し、シグナルペプチドが除去されて成熟体となる場合、それぞれをリガンド前駆体ペプチドおよびリガンド成熟体ペプチドと称することがあるが、両者を総称して単にリガンドペプチドと称することもある。

具体的には、本発明のリガンド決定方法は、本発明の蛋白質、その部分ペプチドもしくはそれらの塩を用いるか、または組換え型蛋白質の発現系を構築し、該発現系を用いたレセプター結合アッセイ系を用いることによって、本発明の蛋白質に結合して細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 $Ca^{2+}$ 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fos活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性）を有する化合物（例えば、ペプチド、蛋白質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物など）またはその塩を決定する方法である。

本発明のリガンド決定方法においては、本発明の蛋白質またはその部分ペプチドと試験化合物とを接触させた場合の、例えば、該蛋白質または該部分ペプチドに対する試験化合物の結合量や、細胞刺激活性などを測定することを特徴とする。

より具体的には、本発明は、①標識した試験化合物を、本発明の蛋白質もしくはその塩または本発明の部分ペプチドもしくはその塩に接触させた場合における、標識した試験化合物の該蛋白質もしくはその塩、または該部分ペプチドもしくはその塩に対する結合量を測定することを特徴とする本発明の蛋白質またはその塩に対するリガンドの決定方法、

②標識した試験化合物を、本発明の蛋白質を含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合における、標識した試験化合物の該細胞または該膜画分に対する結合量を測定することを特徴とする本発明の蛋白質またはその塩に対するリガンドの決定方法、

- 5 ③標識した試験化合物を、本発明の蛋白質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した蛋白質に接触させた場合における、標識した試験化合物の該蛋白質またはその塩に対する結合量を測定することを特徴とする本発明の蛋白質に対するリガンドの決定方法、

- ④試験化合物を、本発明の蛋白質を含有する細胞に接触させた場合における、  
10 蛋白質を介した細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 $Ca^{2+}$ 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を測定することを特徴とする本発明の蛋白質またはその塩に対するリガンドの決定方法、および  
15 よび

- ⑤試験化合物を、本発明の蛋白質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した蛋白質に接触させた場合における、蛋白質を介する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 $Ca^{2+}$ 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を測定することを特徴とする本発明の蛋白質またはその塩に対するリガンドの決定方法を提供する。  
20

- 特に、上記①～③の試験を行ない、試験化合物が本発明の蛋白質に結合することを確認した後に、上記④～⑤の試験を行なうことが好ましい。  
25

まず、リガンド決定方法に用いる蛋白質としては、前記した本発明の蛋白質または本発明の部分ペプチドを含有するものであれば何れのものであってもよいが、動物細胞を用いて大量発現させた蛋白質が適している。

本発明の蛋白質を製造するには、前述の発現方法が用いられるが、該蛋白質をコードするDNAを哺乳動物細胞や昆虫細胞で発現することにより行なうことが好ましい。目的とする蛋白質部分をコードするDNA断片には、通常、相補DNAが用いられるが、必ずしもこれに制約されるものではない。例えば、

5 遺伝子断片や合成DNAを用いてもよい。本発明の蛋白質をコードするDNA断片を宿主動物細胞に導入し、それらを効率よく発現させるためには、該DNA断片を昆虫を宿主とするバキュロウイルスに属する核多角体病ウイルス (nuclear polyhedrosis virus ; NPV) のポリヘドリンプロモーター、SV 40由来のプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネイン

10 プロモーター、ヒトヒートショックプロモーター、サイトメガロウイルスプロモーター、SR $\alpha$ プロモーターなどの下流に組み込むのが好ましい。発現したレセプターの量と質の検査はそれ自体公知の方法で行うことができる。例えば、文献 [Nambi, P. ら、ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.) , 267巻, 19555~19559頁, 1992年] に記載の方法に従って行

15 うことができる。

したがって、本発明のリガンド決定方法において、本発明の蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらの塩を含有するものとしては、それ自体公知の方法に従って精製した蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらの塩であってもよいし、該蛋白質を含有する細胞またはその細胞膜画分を用いてもよい。

20 本発明のリガンド決定方法において、本発明の蛋白質を含有する細胞を用いる場合、該細胞をグルタルアルデヒド、ホルマリンなどで固定化してもよい。固定化方法はそれ自体公知の方法に従って行なうことができる。

本発明の蛋白質を含有する細胞としては、本発明の蛋白質を発現した宿主細胞をいうが、該宿主細胞としては、大腸菌、枯草菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞などが用いられる。

25

細胞膜画分としては、細胞を破碎した後、それ自体公知の方法で得られる細胞膜が多く含まれる画分のことをいう。細胞の破碎方法としては、Potter-Elvehjem型ホモジナイザーで細胞を押し潰す方法、ワーリングブレンダーやポ



リトロン (Kinematica社製) による破碎、超音波による破碎、フレンチプレスなどで加圧しながら細胞を細いノズルから噴出させることによる破碎などが挙げられる。細胞膜の分画には、分画遠心分離法や密度勾配遠心分離法などの遠心力による分画法が主として用いられる。例えば、細胞破碎液を低速 (500 rpm ~ 3000 rpm) で短時間 (通常、約1分 ~ 10分) 遠心し、上清をさらに高速 (15000 rpm ~ 30000 rpm) で通常30分 ~ 2時間遠心し、得られる沈澱を膜画分とする。該膜画分中には、発現した蛋白質と細胞由来のリン脂質や膜蛋白質などの膜成分が多く含まれる。

該蛋白質を含有する細胞やその膜画分中の蛋白質の量は、1細胞当たり  $10^3 \sim 10^8$  分子であるのが好ましく、 $10^5 \sim 10^7$  分子であるのが好適である。なお、発現量が多いほど膜画分当たりのリガンド結合活性 (比活性) が高くなり、高感度なスクリーニング系の構築が可能になるばかりでなく、同一ロットで大量の試料を測定できるようになる。

本発明の蛋白質またはその塩に対するリガンドを決定する前記の① ~ ③の方法を実施するためには、適当な蛋白質画分と、標識した試験化合物が必要である。

蛋白質画分としては、天然型のレセプター蛋白質画分か、またはそれと同等の活性を有する組換え型レセプター画分などが望ましい。ここで、同等の活性とは、同等のリガンド結合活性、シグナル情報伝達作用などを示す。

標識した試験化合物としては、 $[^3\text{H}]$ 、 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ 、 $[^{35}\text{S}]$ などで標識したアンギオテンシン、ボンベシン、カナビノイド、コレシストキニン、グルタミン、セロトニン、メラトニン、ニューロペプチドY、オピオイド、プリン、バソプレッシン、オキシトシン、PACAP、セクレチン、グルカゴン、カルシトニン、アドレノメジュリン、ソマトスタチン、GHRH、CRF、ACTH、GRP、PTH、VIP (バソアクティブ インテスティナル アンド リイテッド ポリペプチド)、ソマトスタチン、ドーパミン、モチリン、アミリン、ブラジキニン、CGRP (カルシトニンジーンリレーティッドペプチド)、ロイコトリエン、パンクレアスタチン、プロスタグランジン、

トロンボキサン、アデノシン、アドレナリン、 $\alpha$ および $\beta$ -ケモカイン (chemokine) (例えば、IL-8、GRO $\alpha$ 、GRO $\beta$ 、GRO $\gamma$ 、NAP-2、ENA-78、PF4、IP10、GCP-2、MCP-1、HC14、MCP-3、I-309、MIP1 $\alpha$ 、MIP-1 $\beta$ 、RANTESなど)、  
5 エンドセリン、エンテロガストリン、ヒスタミン、ニューロテンシン、TRH、  
パンクレアティックポリペプチド、ガラニン、MIT1またはその哺乳動物のホモログなどが好適である。

具体的には、本発明の蛋白質またはその塩に対するリガンドの決定方法を行なうには、まず本発明の蛋白質を含有する細胞または細胞の膜面分を、決定方法に  
10 適したバッファーに懸濁することによりレセプター標品を調製する。バッファーには、pH4~10 (望ましくはpH6~8) のリン酸バッファー、トリス-塩酸バッファーなどのリガンドと本発明の蛋白質との結合を阻害しない  
バッファーであればいずれでもよい。また、非特異的結合を低減させる目的で、CHAPS、Tween-80<sup>TM</sup> (花王-アトラス社)、ジギトニン、デオキシコレートなどの界面活性剤やウシ血清アルブミンやゼラチンなどの各種蛋白質  
15 をバッファーに加えることもできる。さらに、プロテアーゼによるレセプターやリガンドの分解を抑える目的でPMSF、ロイペプチン、E-64 (ペプチド研究所製)、ペプスタチンなどのプロテアーゼ阻害剤を添加することもできる。  
0.01ml~10mlの該レセプター溶液に、一定量(5000cpm~500000cpm)の[<sup>3</sup>H]、[<sup>125</sup>I]、[<sup>14</sup>C]、[<sup>35</sup>S]などで  
20 標識した試験化合物を共存させる。非特異的結合量(NSB)を知るために大過剰の未標識の試験化合物を加えた反応チューブも用意する。反応は約0℃から50℃、望ましくは約4℃から37℃で、約20分から24時間、望ましくは約30分から3時間行なう。反応後、ガラス繊維濾紙等で濾過し、適量の同  
25 バッファーで洗浄した後、ガラス繊維濾紙に残存する放射活性を液体シンチレーションカウンターあるいは $\gamma$ -カウンターで計測する。全結合量(B)から非特異的結合量(NSB)を引いたカウント(B-NSB)が0cpmを越える試験化合物を本発明の蛋白質またはその塩に対するリガンド(アゴニスト)

として選択することができる。

本発明の蛋白質またはその塩に対するリガンドを決定する前記の④～⑤の方法を実施するためには、該蛋白質を介する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 $Ca^{2+}$ 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を公知の方法または市販の測定用キットを用いて測定することができる。具体的には、まず、本発明の蛋白質を含有する細胞をマルチウェルプレート等に培養する。リガンド決定を行なうにあたっては前もって新鮮な培地あるいは細胞に毒性を示さない適当なバッファーに交換し、試験化合物などを添加して一定時間インキュベートした後、細胞を抽出あるいは上清液を回収して、生成した産物をそれぞれの方法に従って定量する。細胞刺激活性の指標とする物質（例えば、アラキドン酸など）の生成が、細胞が含有する分解酵素によって検定困難な場合は、該分解酵素に対する阻害剤を添加してアッセイを行なってもよい。また、cAMP産生抑制などの活性については、フォルスコリンなどで細胞の基礎的産生量を増大させておいた細胞に対する産生抑制作用として検出することができる。

本発明の蛋白質またはその塩に結合するリガンド決定用キットは、本発明の蛋白質もしくはその塩、本発明の部分ペプチドもしくはその塩、本発明の蛋白質を含有する細胞、または本発明の蛋白質を含有する細胞の膜画分などを含有するものである。

本発明のリガンド決定用キットの例としては、次のものが挙げられる。

#### 1. リガンド決定用試薬

##### ①測定用緩衝液および洗浄用緩衝液

Hanks' Balanced Salt Solution（ギブコ社製）に、0.05%のウシ血清アルブミン（シグマ社製）を加えたもの。

孔径0.45  $\mu m$ のフィルターで濾過滅菌し、4℃で保存するか、あるいは用時調製しても良い。

## ②G蛋白質共役型レセプター蛋白質標品

本発明の蛋白質を発現させたCHO細胞を、12穴プレートに $5 \times 10^5$ 個/穴で継代し、37℃、5%CO<sub>2</sub>、95%airで2日間培養したもの。

## ③標識試験化合物

- 5 市販の [<sup>3</sup>H]、[<sup>125</sup>I]、[<sup>14</sup>C]、[<sup>35</sup>S]などで標識した化合物、または適当な方法で標識化したもの

水溶液の状態のものを4℃あるいは-20℃にて保存し、用時に測定用緩衝液にて1μMに希釈する。水に難溶性を示す試験化合物については、ジメチルホルムアミド、DMSO、メタノール等に溶解する。

## 10 ④非標識試験化合物

標識化合物と同じものを100～1000倍濃い濃度に調製する。

### 2. 測定法

- ①12穴組織培養用プレートにて培養した本発明の蛋白質発現CHO細胞を、測定用緩衝液1mlで2回洗浄した後、490μlの測定用緩衝液を各穴に加  
15 える。

②標識試験化合物を5μl加え、室温にて1時間反応させる。非特異的結合量を知るためには非標識試験化合物を5μl加えておく。

- ③反応液を除去し、1mlの洗浄用緩衝液で3回洗浄する。細胞に結合した標識試験化合物を0.2N NaOH-1%SDSで溶解し、4mlの液体シンチ  
20 レーターA（和光純薬製）と混合する。

④液体シンチレーションカウンター（ベックマン社製）を用いて放射活性を測定する。

- 本発明の蛋白質またはその塩に結合することができるリガンドとしては、例えば、脳、下垂体、膵臓などに特異的に存在する物質などが挙げられ、具体的  
25 には、アンギオテンシン、ボンベシン、カナビノイド、コレシストキニン、グルタミン、セロトニン、メラトニン、ニューロペプチドY、オピオイド、プリン、バソプレッシン、オキシトシン、PACAP、セクレチン、グルカゴン、カルシトニン、アドレノメジュリン、ソマトスタチン、GHRH、CRF、A

CTH、GRP、PTH、VIP（バソアクティブ インテスティナル アン  
ド リレイテッド ポリペプチド）、ソマトスタチン、ドーパミン、モチリン、  
アミリン、ブラジキニン、CGRP（カルシトニンジーンリレーティッドペプ  
チド）、ロイコトリエン、パンクレアスタチン、プロスタグランジン、トロン  
5 ポキサン、アデノシン、アドレナリン、 $\alpha$ および $\beta$ -ケモカイン（chemokine）  
（例えば、IL-8、GRO $\alpha$ 、GRO $\beta$ 、GRO $\gamma$ 、NAP-2、ENA-  
78、PF4、IP10、GCP-2、MCP-1、HC14、MCP-3、  
I-309、MIP1 $\alpha$ 、MIP-1 $\beta$ 、RANTESなど）、エンドセリン、  
エンテログストリン、ヒスタミン、ニューロテンシン、TRH、パンクレアテ  
10 イックポリペプチド、ガラニン、MITIまたはその哺乳動物のホモログなどが  
用いられる。

## （2）本発明の蛋白質欠乏症の予防・治療剤

上記（1）の方法において、本発明の蛋白質に対するリガンドが明らかにな  
れば、該リガンドが有する作用に応じて、①本発明の蛋白質または②該蛋白質  
15 をコードするDNAを、本発明の蛋白質の機能不全に関連する疾患の予防およ  
び／または治療剤などの医薬として使用することができる。

例えば、生体内において本発明の蛋白質が減少しているためにリガンドの生  
理作用が期待できない（該蛋白質の欠乏症）患者がいる場合に、①本発明の蛋  
白質を該患者に投与し該蛋白質の量を補充したり、②（イ）本発明の蛋白質を  
20 コードするDNAを該患者に投与し発現させることによって、あるいは（ロ）  
対象となる細胞に本発明の蛋白質をコードするDNAを挿入し発現させた後に、  
該細胞を該患者に移植することなどによって、患者の体内における蛋白質の量  
を増加させ、リガンドの作用を十分に発揮させることができる。したがって、  
本発明の蛋白質をコードするDNAは、安全で低毒性な本発明のレセプター蛋  
25 白質の機能不全に関連する疾患の予防および／または治療剤などの医薬として  
有用である。

本発明の蛋白質または該蛋白質をコードするDNAは中枢疾患（例えばアル  
ツハイマー病・痴呆・摂食障害（拒食症）・てんかんなど）、ホルモン系の疾患（例

えば、微弱陣痛、弛緩出血、胎盤娩出前後、子宮復古不全、帝王切開術、人工妊娠中絶、乳汁うっ滞など）、肝/胆/膵/内分泌疾患（例えば糖尿病・摂食障害など）、炎症性疾患（アレルギー・喘息・リュウマチなど）、循環器疾患（例えば高血圧症・心肥大・狭心症・動脈硬化等）、呼吸器系疾患（例えば、肺炎、喘息、気管支炎、呼吸器感染症、慢性閉塞性肺疾患等）、感染症（例えば、敗血症、MRSA、呼吸器感染症、尿路感染症、胆道感染症、感染性腸炎、中耳炎、前立腺炎等）の予防および／または治療に有用である。

また、本発明の蛋白質または該蛋白質をコードするDNAは消化器疾患（例えば腸炎、下痢、便秘、吸収不良性症候群など）の予防および／または治療に特に有用である。

本発明の蛋白質を上記予防・治療剤として使用する場合は、常套手段に従って製剤化することができる。

一方、本発明の蛋白質をコードするDNA（以下、本発明のDNAと略記する場合がある）を上記予防・治療剤として使用する場合は、本発明のDNAを単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエートウイルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、常套手段に従って実施することができる。本発明のDNAは、そのまま、あるいは摂取促進のための補助剤とともに、遺伝子銃やハイドロゲルカテーテルのようなカテーテルによって投与できる。

例えば、①本発明の蛋白質または②該蛋白質をコードするDNAは、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、①本発明の蛋白質または②該蛋白質をコードするDNAを生理学的に認められる公知の担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製剤実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な用量が得られるようにするものである。

錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えばゼラチン、コーンスターチ、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、前記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含むことができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施に従って処方することができる。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などが用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例、エタノール）、ポリアルコール（例、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン性界面活性剤（例、ポリソルベート 80<sup>TM</sup>、HCO-50）などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが用いられ、溶解補助剤である安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。

また、上記予防・治療剤は、例えば、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防止剤などと配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンプルに充填される。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトや哺乳動物（例えば、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

本発明の蛋白質またはDNAの投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に成人（60 kg とし

- て)の消化器疾患患者においては、一日につき約0.1mg~100mg、好ましくは約1.0~50mg、より好ましくは約1.0~20mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常成人(60kgとして)
- 5 て)の消化器疾患患者においては、一日につき約0.01~30mg程度、好ましくは約0.1~20mg程度、より好ましくは約0.1~10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg当りに換算した量を投与することができる。

### (3) 遺伝子診断剤

- 10 本発明のDNAは、プローブとして使用することにより、ヒトまたは哺乳動物(例えば、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど)における本発明の蛋白質またはその部分ペプチドをコードするDNAまたはmRNAの異常(遺伝子異常)を検出することができるので、例えば、該DNAまたはmRNAの損傷、突然変異あるいは発現低下や、該DNAまたはmRNA
- 15 Aの増加あるいは発現過多などの遺伝子診断剤として有用である。

- 本発明のDNAを用いる上記の遺伝子診断は、例えば、自体公知のノーザンハイブリダイゼーションやPCR-SSCP法(ゲノミックス(Genomics), 第5巻, 874~879頁(1989年)、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ユーエスエー(Proceedings
- 20 of the Natinal Academy of Sciences of the United States of America), 第86巻, 2766~2770頁(1989年))などにより実施することができる。

### (4) 本発明の蛋白質に対するリガンドの定量法

- 本発明の蛋白質等は、リガンドに対して結合性を有しているので、生体内に
- 25 おけるリガンド濃度を感度良く定量することができる。

本発明の定量法は、例えば、競合法と組み合わせることによって用いることができる。すなわち、被検体を本発明の蛋白質等と接触させることによって被検体中のリガンド濃度を測定することができる。具体的には、例えば、以下の



①または②などに記載の方法あるいはそれに準じる方法に従って用いることができる。

①入江寛編「ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和49年発行)

②入江寛編「続ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和54年発行)

5 (5) 本発明の蛋白質とリガンドとの結合性を变化させる化合物のスクリーニング方法

本発明の蛋白質等を用いるか、または組換え型蛋白質等の発現系を構築し、該発現系を用いたレセプター結合アッセイ系を用いることによって、リガンドと本発明の蛋白質等との結合性を变化させる化合物(例えば、ペプチド、蛋白質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物など)またはその塩を効率よくスクリーニングすることができる。

このような化合物には、(イ) G蛋白質共役型レセプターを介して細胞刺激活性(例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 $Ca^{2+}$ 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜  
15 電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など)を有する化合物(いわゆる、本発明の蛋白質に対するアゴニスト)、(ロ) 該細胞刺激活性を有しない化合物(いわゆる、本発明の蛋白質に対するアンタゴニスト)、(ハ) リガンドと本発明の蛋白質との結合力を増強する化合物、あるいは(ニ) リガンドと本発明の蛋白質との結合力を減少させる化合物などが含まれる(なお、上記(イ)の化合物は、前記したリガンド決定方法によってスクリーニングすることが好ましい)。

すなわち、本発明は、(i) 本発明の蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらの塩と、リガンドとを接触させた場合と(ii) 本発明の蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらの塩と、リガンドおよび試験化合物とを接触させた場合との比較を行なうことを特徴とするリガンドと本発明の蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらの塩との結合性を变化させる化合物またはその塩のスクリー  
25 ニング方法を提供する。

本発明のスクリーニング方法においては、(i) と(ii) の場合における、

例えば、該蛋白質等に対するリガンドの結合量、細胞刺激活性などを測定して、比較することを特徴とする。

より具体的には、本発明は、

- ①標識したリガンドを、本発明の蛋白質等に接触させた場合と、標識したリ  
5    ンドおよび試験化合物を本発明の蛋白質等に接触させた場合における、標識し  
たリガンドの該蛋白質等に対する結合量を測定し、比較することを特徴とする  
リガンドと本発明の蛋白質等との結合性を変化させる化合物またはその塩のス  
クリーニング方法、
- ②標識したリガンドを、本発明の蛋白質等を含有する細胞または該細胞の膜面  
10    分に接触させた場合と、標識したリガンドおよび試験化合物を本発明の蛋白質  
等を含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合における、標識した  
リガンドの該細胞または該膜画分に対する結合量を測定し、比較することを特  
徴とするリガンドと本発明の蛋白質等との結合性を変化させる化合物またはそ  
の塩のスクリーニング方法、
- ③標識したリガンドを、本発明のDNAを含有する形質転換体を培養すること  
15    によって細胞膜上に発現した蛋白質等に接触させた場合と、標識したリガンド  
および試験化合物を本発明のDNAを含有する形質転換体を培養することによ  
って細胞膜上に発現した本発明の蛋白質等に接触させた場合における、標識し  
たリガンドの該蛋白質等に対する結合量を測定し、比較することを特徴とする  
20    リガンドと本発明の蛋白質等との結合性を変化させる化合物またはその塩のス  
クリーニング方法、
- ④本発明の蛋白質等を活性化する化合物（例えば、本発明の蛋白質等に対する  
リガンドなど）を本発明の蛋白質等を含有する細胞に接触させた場合と、本発  
明の蛋白質等を活性化する化合物および試験化合物を本発明の蛋白質等を含有  
25    する細胞に接触させた場合における、レセプターを介した細胞刺激活性（例え  
ば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 $Ca^{2+}$ 遊離、細胞内cA  
MP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、  
細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活

性または抑制する活性など)を測定し、比較することを特徴とするリガンドと本発明の蛋白質等との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、および

- ⑤本発明の蛋白質等を活性化する化合物(例えば、本発明の蛋白質等に対するリガンドなど)を本発明のDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した本発明の蛋白質等に接触させた場合と、本発明の蛋白質等を活性化する化合物および試験化合物を本発明のDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した本発明の蛋白質等に接触させた場合における、レセプターを介する細胞刺激活性(例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 $Ca^{2+}$ 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など)を測定し、比較することを特徴とするリガンドと本発明の蛋白質等との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。
- 15 本発明の蛋白質等が得られる以前は、G蛋白質共役型レセプターアゴニストまたはアンタゴニストをスクリーニングする場合、まずラットなどのG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含む細胞、組織またはその細胞膜画分を用いて候補化合物を得て(一次スクリーニング)、その後該候補化合物が実際にヒトのG蛋白質共役型レセプター蛋白質とリガンドとの結合を阻害するか否かを確認する試験(二次スクリーニング)が必要であった。細胞、組織または細胞膜画分をそのまま用いれば他のレセプター蛋白質も混在するために、目的とするレセプター蛋白質に対するアゴニストまたはアンタゴニストを実際にスクリーニングすることは困難であった。

- 25 しかしながら、例えば、本発明のヒト由来蛋白質を用いることによって、一次スクリーニングの必要がなくなり、リガンドとG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合を阻害する化合物を効率良くスクリーニングすることができる。さらに、スクリーニングされた化合物がアゴニストかアンタゴニストかを簡便に評価することができる。

本発明のスクリーニング方法の具体的な説明を以下にする。

まず、本発明のスクリーニング方法に用いる本発明の蛋白質等としては、前記した本発明の蛋白質等を含有するものであれば何れのものであってもよいが、本発明の蛋白質等を含有する哺乳動物の臓器の細胞膜画分が好適である。しかし、特にヒト由来の臓器は入手が極めて困難なことから、スクリーニングに用いられるものとしては、組換え体を用いて大量発現させたヒト由来のレセプター蛋白質等などが適している。

本発明の蛋白質等を製造するには、前述の方法が用いられるが、本発明のDNAを哺乳細胞や昆虫細胞で発現することにより行なうことが好ましい。目的とする蛋白質部分をコードするDNA断片には相補DNAが用いられるが、必ずしもこれに制約されるものではない。例えば、遺伝子断片や合成DNAを用いてもよい。本発明の蛋白質をコードするDNA断片を宿主動物細胞に導入し、それらを効率よく発現させるためには、該DNA断片を昆虫を宿主とするバキュロウイルスに属する核多角体病ウイルス (nuclear polyhedrosis virus ; NPV) のポリヘドリンプロモーター、SV40由来のプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒトヒートショックプロモーター、サイトメガロウイルスプロモーター、SR $\alpha$ プロモーターなどの下流に組み込むのが好ましい。発現したレセプターの量と質の検査はそれ自体公知の方法で行うことができる。例えば、文献 [Nambi, P. ら、ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.), 267巻, 19555 ~ 19559頁, 1992年] に記載の方法に従って行なうことができる。

したがって、本発明のスクリーニング方法において、本発明の蛋白質等を含有するものとしては、それ自体公知の方法に従って精製した蛋白質等であってもよいし、該蛋白質等を含有する細胞を用いてもよく、また該蛋白質等を含有する細胞の膜画分を用いてもよい。

本発明のスクリーニング方法において、本発明の蛋白質等を含有する細胞を用いる場合、該細胞をグルタルアルデヒド、ホルマリンなどで固定化してもよい。固定化方法はそれ自体公知の方法に従って行なうことができる。

本発明の蛋白質等を含有する細胞としては、該蛋白質等を発現した宿主細胞をいうが、該宿主細胞としては、大腸菌、枯草菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞などが好ましい。

細胞膜画分としては、細胞を破碎した後、それ自体公知の方法で得られる細胞膜が多く含まれる画分のことをいう。細胞の破碎方法としては、Potter-Elvehjem型ホモジナイザーで細胞を押し潰す方法、ワーリングブレンダーやポリトロン（Kinematica社製）のよる破碎、超音波による破碎、フレンチプレスなどで加圧しながら細胞を細いノズルから噴出させることによる破碎などが挙げられる。細胞膜の分画には、分画遠心分離法や密度勾配遠心分離法などの遠心力による分画法が主として用いられる。例えば、細胞破碎液を低速（500 rpm～3000 rpm）で短時間（通常、約1分～10分）遠心し、上清をさらに高速（15000 rpm～30000 rpm）で通常30分～2時間遠心し、得られる沈澱を膜画分とする。該膜画分中には、発現した蛋白質等と細胞由来のリン脂質や膜蛋白質などの膜成分が多く含まれる。

該蛋白質等を含有する細胞や膜画分中の該蛋白質の量は、1細胞当たり $10^3 \sim 10^8$ 分子であるのが好ましく、 $10^5 \sim 10^7$ 分子であるのが好適である。なお、発現量が多いほど膜画分当たりのリガンド結合活性（比活性）が高くなり、高感度なスクリーニング系の構築が可能になるばかりでなく、同一ロットで大量の試料を測定できるようになる。

リガンドと本発明の蛋白質等との結合性を変化させる化合物をスクリーニングする前記の①～③を実施するためには、例えば、適当な蛋白質画分と、標識したリガンドが必要である。

蛋白質画分としては、天然型のレセプター蛋白質画分か、またはそれと同等の活性を有する組換え型レセプター蛋白質画分などが望ましい。ここで、同等の活性とは、同等のリガンド結合活性、シグナル情報伝達作用などを示す。

標識したリガンドとしては、標識したリガンド、標識したリガンドアナログ化合物などが用いられる。例えば $[^3\text{H}]$ 、 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ 、 $[^{35}\text{S}]$ などで標識されたリガンドなどが用いられる。

具体的には、リガンドと本発明の蛋白質等との結合性を変化させる化合物のスクリーニングを行なうには、まず本発明の蛋白質等を含有する細胞または細胞の膜画分を、スクリーニングに適したバッファーに懸濁することにより蛋白質標品を調製する。バッファーには、pH 4~10（望ましくはpH 6~8）  
5 のリン酸バッファー、トリス-塩酸バッファーなどのリガンドと蛋白質との結合を阻害しないバッファーであればいずれでもよい。また、非特異的結合を低減させる目的で、CHAPS、Tween-80<sup>TM</sup>（花王-アトラス社）、ジギトニン、デオキシコレートなどの界面活性剤をバッファーに加えることもできる。さらに、プロテアーゼによるレセプターやリガンドの分解を抑える目的  
10 でPMSF、ロイペプチン、E-64（ペプチド研究所製）、ペプスタチンなどのプロテアーゼ阻害剤を添加することもできる。0.01ml~10mlの該レセプター溶液に、一定量（5000cpm~500000cpm）の標識したリガンドを添加し、同時に $10^{-4}$ M~ $10^{-10}$ Mの試験化合物を共存させる。非特異的結合量（NSB）を知るために大過剰の未標識のリガンドを加えた反  
15 応チューブも用意する。反応は約0℃から50℃、望ましくは約4℃から37℃で、約20分から24時間、望ましくは約30分から3時間行う。反応後、ガラス繊維濾紙等で濾過し、適量の同バッファーで洗浄した後、ガラス繊維濾紙に残存する放射活性を液体シンチレーションカウンターまたはγ-カウンターで計測する。拮抗する物質がない場合のカウント（ $B_0$ ）から非特異的結合量（NSB）を引いたカウント（ $B_0 - NSB$ ）を100%とした時、特異的結合量（ $B - NSB$ ）が、例えば、50%以下になる試験化合物を拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。

リガンドと本発明の蛋白質等との結合性を変化させる化合物スクリーニングする前記の④~⑤の方法を実施するためには、例えば、蛋白質を介する細胞刺  
25 激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 $Ca^{2+}$ 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を公知の方法または市販の測定用キッ

トを用いて測定することができる。

具体的には、まず、本発明の蛋白質等を含有する細胞をマルチウェルプレート等に培養する。スクリーニングを行なうにあたっては前もって新鮮な培地あるいは細胞に毒性を示さない適当なバッファーに交換し、試験化合物などを添加して一定時間インキュベートした後、細胞を抽出あるいは上清液を回収して、生成した産物をそれぞれの方法に従って定量する。細胞刺激活性の指標とする物質（例えば、アラキドン酸など）の生成が、細胞が含有する分解酵素によって検定困難な場合は、該分解酵素に対する阻害剤を添加してアッセイを行なってもよい。また、cAMP産生抑制などの活性については、フォルスコリンなどで細胞の基礎的産生量を増大させておいた細胞に対する産生抑制作用として検出することができる。

細胞刺激活性を測定してスクリーニングを行なうには、適当な蛋白質を発現した細胞が必要である。本発明の蛋白質等を発現した細胞としては、天然型の本発明の蛋白質等を有する細胞株、前述の組換え型蛋白質等を発現した細胞株などが望ましい。

試験化合物としては、例えば、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などが用いられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

リガンドと本発明の蛋白質等との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キットは、本発明の蛋白質等、本発明の蛋白質等を含有する細胞、または本発明の蛋白質等を含有する細胞の膜画分を含有するものなどである。

本発明のスクリーニング用キットの例としては、次のものが挙げられる。

## 25 1. スクリーニング用試薬

### ①測定用緩衝液および洗浄用緩衝液

Hanks' Balanced Salt Solution（ギブコ社製）に、0.05%のウシ血清アルブミン（シグマ社製）を加えたもの。

孔径  $0.45 \mu\text{m}$  のフィルターで濾過滅菌し、 $4^\circ\text{C}$  で保存するか、あるいは用時調製しても良い。

## ② G蛋白質共役型レセプター標品

本発明の蛋白質を発現させた CHO 細胞を、12穴プレートに  $5 \times 10^5$  個  
5 /穴で継代し、 $37^\circ\text{C}$ 、 $5\% \text{CO}_2$ 、 $95\% \text{air}$  で2日間培養したもの。

## ③ 標識リガンド

市販の  $[^3\text{H}]$ 、 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ 、 $[^{35}\text{S}]$  などて標識したリガンド  
水溶液の状態のものを  $4^\circ\text{C}$  あるいは  $-20^\circ\text{C}$  にて保存し、用時に測定用緩衝  
液にて  $1 \mu\text{M}$  に希釈する。

## 10 ④ リガンド標準液

リガンドを  $0.1\%$  ウシ血清アルブミン (シグマ社製) を含む PBS で  $1 \text{mM}$   
となるように溶解し、 $-20^\circ\text{C}$  で保存する。

## 2. 測定法

① 12穴組織培養用プレートにて培養した本発明の蛋白質発現 CHO 細胞を、  
15 測定用緩衝液  $1 \text{ml}$  で2回洗浄した後、 $490 \mu\text{l}$  の測定用緩衝液を各穴に加  
える。

②  $10^{-3} \sim 10^{-10} \text{M}$  の試験化合物溶液を  $5 \mu\text{l}$  加えた後、標識リガンドを  $5 \mu\text{l}$  加え、室温にて1時間反応させる。非特異的結合量を知るためには試験化合物の代わりに  $10^{-3} \text{M}$  のリガンドを  $5 \mu\text{l}$  加えておく。

20 ③ 反応液を除去し、 $1 \text{ml}$  の洗浄用緩衝液で3回洗浄する。細胞に結合した標識リガンドを  $0.2 \text{N NaOH} - 1\% \text{SDS}$  で溶解し、 $4 \text{ml}$  の液体シンチレーター A (和光純薬製) と混合する。

④ 液体シンチレーションカウンター (ベックマン社製) を用いて放射活性を測定し、Percent Maximum Binding (PMB) を次の式で求める。

25

$$\text{PMB} = [ (B - \text{NSB}) / (B_0 - \text{NSB}) ] \times 100$$

PMB : Percent Maximum Binding

B : 検体を加えた時の値



NSB : Non-specific Binding (非特異的結合量)

$B_0$  : 最大結合量

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られ  
5 る化合物またはその塩は、リガンドと本発明の蛋白質等との結合性を変化させる作用を有する化合物であり、具体的には、(イ) G蛋白質共役型レセプターを介して細胞刺激活性(例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 $Ca^{2+}$ 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、  
10 pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など)を有する化合物(いわゆる、本発明の蛋白質に対するアゴニスト)、(ロ)該細胞刺激活性を有しない化合物(いわゆる、本発明の蛋白質に対するアンタゴニスト)、(ハ)リガンドと本発明のG蛋白質共役型蛋白質との結合力を増強する化合物、あるいは(ニ)リガンドと本発明のG蛋白質共役型蛋白質との結合力を減少させる化  
15 合物である。

該化合物としては、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

本発明の蛋白質等に対するアゴニストは、本発明の蛋白質等に対するリガ  
20 ドが有する生理活性と同様の作用を有しているので、該リガンド活性に応じて安全で低毒性な医薬 [例えば、中枢疾患(例えばアルツハイマー病・痴呆・摂食障害(拒食症)・てんかんなど)、ホルモン系の疾患(例えば、微弱陣痛、弛緩出血、胎盤娩出前後、子宮復古不全、帝王切開術、人工妊娠中絶、乳汁うっ滞など)、肝/胆/膵/内分泌疾患(例えば糖尿病・摂食障害など)、炎症性疾患(アレルギー・喘息・リュウマチなど)、循環器疾患(例えば高血圧症・心肥大・狭心症・動脈硬化等)、呼吸器系疾患(例えば、肺炎、喘息、気管支炎、呼吸器感染症、慢性閉塞性肺疾患等)、感染症(例えば、敗血症、MRSA、呼吸器感染症、  
25 尿路感染症、胆道感染症、感染性腸炎、中耳炎、前立腺炎等)の予防および／

または治療剤など]として有用である。

また、本発明の蛋白質等に対するアゴニストは、本発明の蛋白質等に対するリガンドが有する生理活性と同様の作用を有しているので、該リガンド活性に応じて安全で低毒性な消化器疾患(例えば腸炎、下痢、便秘、吸収不良性症候群  
5 などの)の予防および/または治療剤として特に有用である。

本発明の蛋白質等に対するアンタゴニストは、本発明の蛋白質等に対するリガンドが有する生理活性を抑制することができるので、該リガンド活性を抑制する安全で低毒性な医薬[例えば、ホルモン分泌調節薬、本発明の蛋白質等に対するリガンドの過剰な産生によって惹起される中枢疾患、ホルモン系の疾患、  
10 肝/胆/膵/内分泌疾患(例えば抗肥満薬・摂食過剰など)、炎症性疾患、循環器疾患、呼吸器系疾患)、感染症の予防および/または治療薬など]として有用である。

本発明の蛋白質等に対するアンタゴニストは、本発明の蛋白質等に対するリガンドが有する生理活性を抑制することができるので、該リガンド活性を抑制  
15 する安全で低毒性な消化器疾患(例えば腸炎、下痢、便秘、吸収不良性症候群などの)の予防および/または治療剤として特に有用である。

リガンドと本発明の蛋白質との結合力を減少させる化合物は、本発明の蛋白質等に対するリガンドが有する生理活性を減少させるための安全で低毒性な医薬[例えば、ホルモン分泌調節薬、本発明の蛋白質等に対するリガンドの過剰な  
20 産生によって惹起される中枢疾患、ホルモン系の疾患、肝/胆/膵/内分泌疾患(例えば抗肥満薬・摂食過剰など)、炎症性疾患、循環器疾患、呼吸器系疾患、感染症の予防および/または治療薬など]として有用である。

リガンドと本発明の蛋白質との結合力を減少させる化合物は、本発明の蛋白質等に対するリガンドが有する生理活性を減少させることができるので、安全  
25 で低毒性な消化器疾患(例えば腸炎、下痢、便秘、吸収不良性症候群などの)の予防および/または治療剤として特に有用である。

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩を上述の医薬組成物として使用する場合、常套手段に従

### Tissue distribution

5 A set of normalised human cDNA was used to amplify a short gene fragment to examine the tissue distribution of ICSR-1. For this purpose the clontech Multiple Tissue cDNA Panels Human I #K1420-1 (lot 020477) and Human II #K1427-1 (lot 9070211) (Clontech Laboratories GmbH, Heidelberg Germany) were used with two ICSR-1 gene-specific primers. With the gene-specific primers KD3 (SEQ ID NO: 3) and KD8 (SEQ ID NO: 4) a 565 bp fragment could be amplified. The PCR conditions were 30 sec at 94 °C, 30 sec at 94°C and 2 min at 68°C for 38 cycles and a final  
10 elongation step at 68°C for 5 min using the advantage polymerase mixture purchased from Clontech Laboratories GmbH, Heidelberg Germany (Kit Clontech, No. K1910-1) and according to the human cardiovascular MTC panel Clontech manual (No. 1427-1).

15 The 565 bp fragment has been analysed on an agarose gel, visualized with ethidium bormide. ICSR-1 has been detected in a multiple tissue panel specifically in heart tissue Figure 1 A. A more detailed investigation indicated that ICSR-1 is expressed in the adult as well as in the fetal heart. Within the heart it could be specifically detected in ventricle derived tissues (Figure 1 B).

### Claims

1. An isolated polypeptide selected from one of the groups consisting of:
  - (a) an isolated polypeptide encoded by a polynucleotide comprising the sequence of SEQ ID NO:1;
  - 5 (b) an isolated polypeptide comprising a polypeptide sequence having at least 95% identity to the polypeptide sequence of SEQ ID NO:2;
  - c) an isolated polypeptide having at least 95% identity to the polypeptide sequence of SEQ ID NO:2; and
  - d) the polypeptide sequence of SEQ ID NO:2 and
  - 10 (e) fragments and variants of such polypeptides in (a) to (d).
2. The isolated polypeptide as claimed in claim 1 comprising the polypeptide sequence of SEQ ID NO:2.
- 15 3. The isolated polypeptide as claimed in claim 1 which is the polypeptide sequence of SEQ ID NO:2.
4. An isolated polynucleotide selected from one of the groups consisting of:
  - (a) an isolated polynucleotide comprising a polynucleotide sequence having at least 95% identity to the polynucleotide sequence of SEQ ID NO:1;
  - 20 (b) an isolated polynucleotide having at least 95% identity to the polynucleotide of SEQ ID NO:1;
  - (c) an isolated polynucleotide comprising a polynucleotide sequence encoding a polypeptide sequence having at least 95% identity to the polypeptide sequence of SEQ ID NO:2;
  - 25 (d) an isolated polynucleotide having a polynucleotide sequence encoding a polypeptide sequence having at least 95% identity to the polypeptide sequence of SEQ ID NO:2;

- 35 -

- (e) an isolated polynucleotide with a nucleotide sequence of at least 100 nucleotides obtained by screening a library under stringent hybridization conditions with a labeled probe having the sequence of SEQ ID NO: 1 or a fragment thereof having at least 15 nucleotides;
- 5 (f) a polynucleotide which is the RNA equivalent of a polynucleotide of (a) to (e);
- or a polynucleotide sequence complementary to said isolated polynucleotide
- and polynucleotides that are variants and fragments of the above mentioned polynucleotides or that are complementary to above mentioned polynucleotides, over the entire length thereof.
- 10
5. An isolated polynucleotide as claimed in claim 4 selected from the group consisting of:
- (a) an isolated polynucleotide comprising the polynucleotide of SEQ ID NO:1;
- (b) the isolated polynucleotide of SEQ ID NO:1;
- 15 (c) an isolated polynucleotide comprising a polynucleotide sequence encoding the polypeptide of SEQ ID NO:2; and
- (d) an isolated polynucleotide encoding the polypeptide of SEQ ID NO:2.
- 20
6. An expression system comprising a polynucleotide capable of producing a polypeptide of claim 1 when said expression vector is present in a compatible host cell.
7. A recombinant host cell comprising the expression vector of claim 6 or a membrane thereof expressing the polypeptide of claim 1.
- 25
8. A process for producing a polypeptide of claim 1 comprising the step of culturing a host cell as defined in claim 7 under conditions sufficient for the

production of said polypeptide and recovering the polypeptide from the culture medium.

9. A fusion protein consisting of the Immunoglobulin Fc-region and any one polypeptide of claim 1.
10. An antibody immunospecific for the polypeptide of any one of claims 1 to 3.
11. A method for screening to identify compounds that stimulate or inhibit the function or level of the polypeptide of claim 1 comprising a method selected from the group consisting of:
- 10 (a) measuring or, detecting, quantitatively or qualitatively, the binding of a candidate compound to the polypeptide (or to the cells or membranes expressing the polypeptide) or a fusion protein thereof by means of a label directly or indirectly associated with the candidate compound;
- 15 (b) measuring the competition of binding of a candidate compound to the polypeptide (or to the cells or membranes expressing the polypeptide) or a fusion protein thereof in the presence of a labeled competitor;
- (c) testing whether the candidate compound results in a signal generated by activation or inhibition of the polypeptide, using detection systems appropriate to the cells or cell membranes expressing the polypeptide;
- 20 (d) mixing a candidate compound with a solution containing a polypeptide of claim 1, to form a mixture, measuring activity of the polypeptide in the mixture, and comparing the activity of the mixture to a control mixture which contains no candidate compound; or
- (e) detecting the effect of a candidate compound on the production of mRNA encoding said polypeptide or said polypeptide in cells, using for instance, an ELISA assay, and
- 25 (f) producing said compound according to biotechnological or chemical standard techniques.

# Multiple Tissue cDNA PCR

Figure 1 A

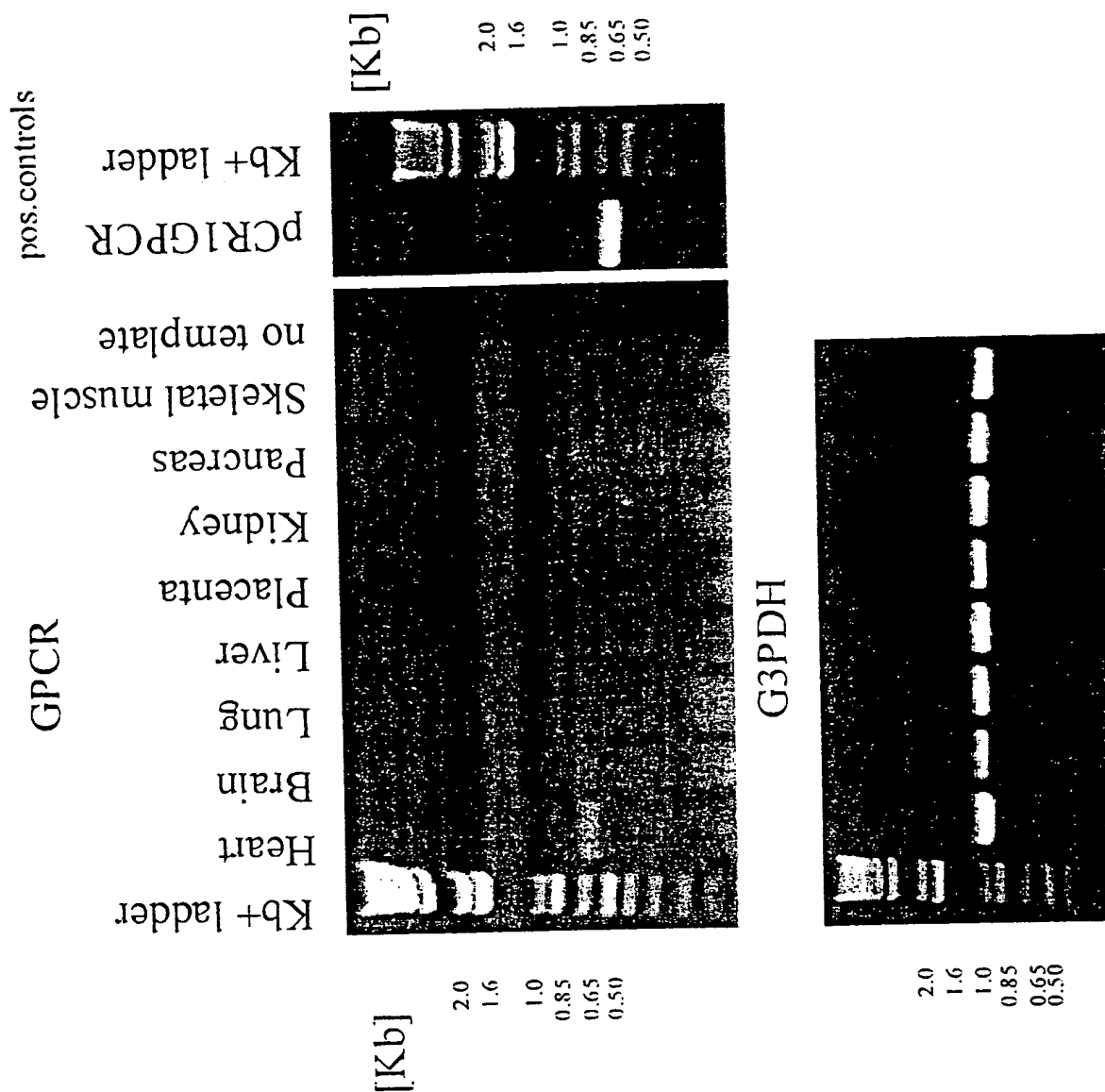
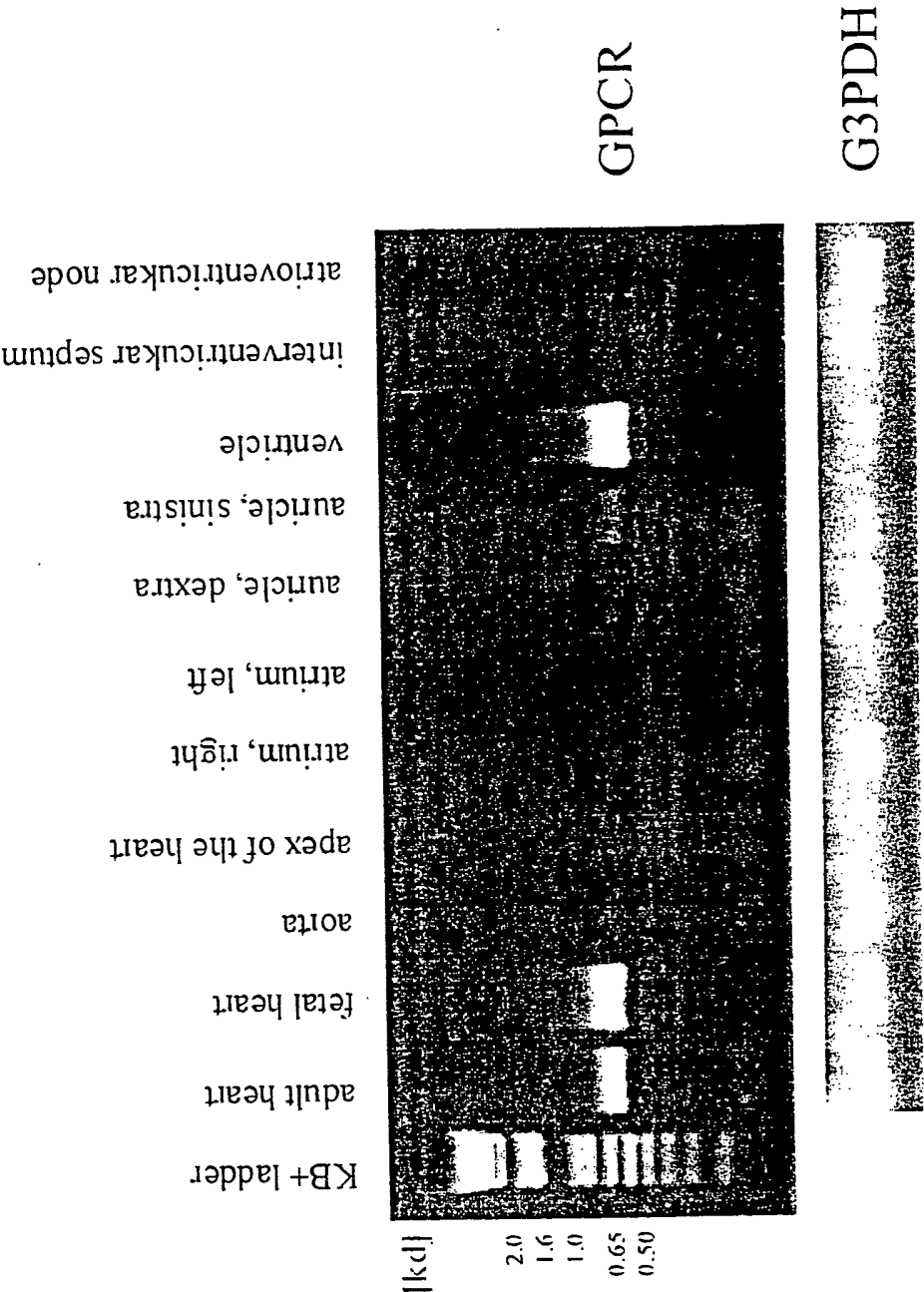


Figure 1 B

Multiple Tissue Heart cDNA PCR





## SEQUENCE LISTING

<110> Merck Patent GmbH

5 <120> New GPC receptor (ICSR-1)

<130> ICSR-1KDWS

<140>

10 <141>

<160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.1

15 <210> 1

<211> 1119

<212> DNA

<213> Homo sapiens

20 <220>

<221> CDS

<222> (1)..(1119)

25 <400> 1

atg tta gcc aac agc tcc tca acc aac agt tct gtt ctc ccg tgt cct	48
Met Leu Ala Asn Ser Ser Ser Thr Asn Ser Ser Val Leu Pro Cys Pro	
1 5 10 15	

30 gac tac cga cct acc cac cgc ctg cac ttg gtg gtc tac agc ttg gtg 96

Asp Tyr Arg Pro Thr His Arg Leu His Leu Val Val Tyr Ser Leu Val	
20 25 30	

35 ctg gct gcc ggg ctc ccc ctc aac gcg cta gcc ctc tgg gtc ttc ctg 144

Leu Ala Ala Gly Leu Pro Leu Asn Ala Leu Ala Leu Trp Val Phe Leu	
35 40 45	

40 cgc gcg ctg cgc gtg cac tcg gtg gtg agc gtg tac atg tgt aac ctg 192

Arg Ala Leu Arg Val His Ser Val Val Ser Val Tyr Met Cys Asn Leu	
50 55 60	

45 gcg gcc agc gac ctg ctc ttc acc ctc tcg ctg ccc gtt cgt ctc tcc 240

Ala Ala Ser Asp Leu Leu Phe Thr Leu Ser Leu Pro Val Arg Leu Ser	
65 70 75 80	

50 tac tac gca ctg cac cac tgg ccc ttc ccc gac ctc ctg tgc cag acg 288

Tyr Tyr Ala Leu His His Trp Pro Phe Pro Asp Leu Leu Cys Gln Thr	
85 90 95	

55 acg ggc gcc atc ttc cag atg aac atg tac ggc agc tgc atc ttc ctg 336

Thr Gly Ala Ile Phe Gln Met Asn Met Tyr Gly Ser Cys Ile Phe Leu	
100 105 110	

55 atg ctc atc aac gtg gac cgc tac gcc gcc atc gtg cac ccg ctg cga 384

Met Leu Ile Asn Val Asp Arg Tyr Ala Ala Ile Val His Pro Leu Arg	
115 120 125	

60 ctg cgc cac ctg cgg cgg ccc cgc gtg gcg cgg ctg ctc tgc ctg ggc 432

Leu Arg His Leu Arg Arg Pro Arg Val Ala Arg Leu Leu Cys Leu Gly	
130 135 140	

	gtg tgg gcg ctc atc ctg gtg ttt gcc gtg ccc gcc gcc cgc gtg cac	480
	Val Trp Ala Leu Ile Leu Val Phe Ala Val Pro Ala Ala Arg Val His	
	145 150 155 160	
5	agg ccc tcg cgt tgc cgc tac cgg gac ctc gag gtg cgc cta tgc ttc	528
	Arg Pro Ser Arg Cys Arg Tyr Arg Asp Leu Glu Val Arg Leu Cys Phe	
	165 170 175	
10	gag agc ttc agc gac gag ctg tgg aaa gcc agg ctg ctg ccc ctc gtg	576
	Glu Ser Phe Ser Asp Glu Leu Trp Lys Gly Arg Leu Leu Pro Leu Val	
	180 185 190	
15	ctg ctg gcc gag gcg ctg gcc ttc ctg ctg ccc ctg gcg gcg gtg gtc	624
	Leu Leu Ala Glu Ala Leu Gly Phe Leu Leu Pro Leu Ala Ala Val Val	
	195 200 205	
20	tac tcg tcg ggc cga gtc ttc tgg acg ctg gcg cgc ccc gac gcc acg	672
	Tyr Ser Ser Gly Arg Val Phe Trp Thr Leu Ala Arg Pro Asp Ala Thr	
	210 215 220	
25	cag agc cag cgg cgg cgg aag acc gtg cgc ctc ctg ctg gct aac ctc	720
	Gln Ser Gln Arg Arg Arg Lys Thr Val Arg Leu Leu Leu Ala Asn Leu	
	225 230 235 240	
25	gtc atc ttc ctg ctg tgc ttc gtg ccc tac aac agc acg ctg gcg gtc	768
	Val Ile Phe Leu Leu Cys Phe Val Pro Tyr Asn Ser Thr Leu Ala Val	
	245 250 255	
30	tac ggg ctg ctg cgg agc aag ctg gtg gcg gcc agc gtg cct gcc cgc	816
	Tyr Gly Leu Leu Arg Ser Lys Leu Val Ala Ala Ser Val Pro Ala Arg	
	260 265 270	
35	gat cgc gtg cgc ggg gtg ctg atg gtg atg gtg ctg ctg gcc gcc gcc	864
	Asp Arg Val Arg Gly Val Leu Met Val Met Val Leu Leu Ala Gly Ala	
	275 280 285	
40	aac tgc gtg ctg gac ccg ctg gtg tac tac ttt agc gcc gag gcc ttc	912
	Asn Cys Val Leu Asp Pro Leu Val Tyr Tyr Phe Ser Ala Glu Gly Phe	
	290 295 300	
45	cgc aac acc ctg cgc gcc ctg gcc act ccg cac cgg gcc agg acc tcg	960
	Arg Asn Thr Leu Arg Gly Leu Gly Thr Pro His Arg Ala Arg Thr Ser	
	305 310 315 320	
45	gcc acc aac ggg acg cgg gcg gcg ctc gcg caa tcc gaa agg tcc gcc	1008
	Ala Thr Asn Gly Thr Arg Ala Ala Leu Ala Gln Ser Glu Arg Ser Ala	
	325 330 335	
50	gtc acc acc gac gcc acc agg ccg gat gcc gcc agt cag ggg ctg ctc	1056
	Val Thr Thr Asp Ala Thr Arg Pro Asp Ala Ala Ser Gln Gly Leu Leu	
	340 345 350	
55	cga ccc tcc gac tcc cac tct ctg tct tcc ttc aca cag tgt ccc cag	1104
	Arg Pro Ser Asp Ser His Ser Leu Ser Ser Phe Thr Gln Cys Pro Gln	
	355 360 365	
60	gat tcc gcc ctc tga	1119
	Asp Ser Ala Leu	
	370	

<210> 2  
 <211> 372  
 <212> PRT  
 5 <213> Homo sapiens

<400> 2  
 Met Leu Ala Asn Ser Ser Ser Thr Asn Ser Ser Val Leu Pro Cys Pro  
 1 5 10 15  
 10 Asp Tyr Arg Pro Thr His Arg Leu His Leu Val Val Tyr Ser Leu Val  
 20 25 30  
 Leu Ala Ala Gly Leu Pro Leu Asn Ala Leu Ala Leu Trp Val Phe Leu  
 35 40 45  
 Arg Ala Leu Arg Val His Ser Val Val Ser Val Tyr Met Cys Asn Leu  
 50 55 60  
 15 Ala Ala Ser Asp Leu Leu Phe Thr Leu Ser Leu Pro Val Arg Leu Ser  
 65 70 75 80  
 Tyr Tyr Ala Leu His His Trp Pro Phe Pro Asp Leu Leu Cys Gln Thr  
 85 90 95  
 20 Thr Gly Ala Ile Phe Gln Met Asn Met Tyr Gly Ser Cys Ile Phe Leu  
 100 105 110  
 Met Leu Ile Asn Val Asp Arg Tyr Ala Ala Ile Val His Pro Leu Arg  
 115 120 125  
 Leu Arg His Leu Arg Arg Pro Arg Val Ala Arg Leu Leu Cys Leu Gly  
 130 135 140  
 25 Val Trp Ala Leu Ile Leu Val Phe Ala Val Pro Ala Ala Arg Val His  
 145 150 155 160  
 Arg Pro Ser Arg Cys Arg Tyr Arg Asp Leu Glu Val Arg Leu Cys Phe  
 165 170 175  
 30 Glu Ser Phe Ser Asp Glu Leu Trp Lys Gly Arg Leu Leu Pro Leu Val  
 180 185 190  
 Leu Leu Ala Glu Ala Leu Gly Phe Leu Leu Pro Leu Ala Val Val  
 195 200 205  
 Tyr Ser Ser Gly Arg Val Phe Trp Thr Leu Ala Arg Pro Asp Ala Thr  
 210 215 220  
 35 Gln Ser Gln Arg Arg Arg Lys Thr Val Arg Leu Leu Leu Ala Asn Leu  
 225 230 235 240  
 Val Ile Phe Leu Leu Cys Phe Val Pro Tyr Asn Ser Thr Leu Ala Val  
 245 250 255  
 40 Tyr Gly Leu Leu Arg Ser Lys Leu Val Ala Ala Ser Val Pro Ala Arg  
 260 265 270  
 Asp Arg Val Arg Gly Val Leu Met Val Met Val Leu Leu Ala Gly Ala  
 275 280 285  
 Asn Cys Val Leu Asp Pro Leu Val Tyr Tyr Phe Ser Ala Glu Gly Phe  
 290 295 300  
 45 Arg Asn Thr Leu Arg Gly Leu Gly Thr Pro His Arg Ala Arg Thr Ser  
 305 310 315 320  
 Ala Thr Asn Gly Thr Arg Ala Ala Leu Ala Gln Ser Glu Arg Ser Ala  
 325 330 335  
 50 Val Thr Thr Asp Ala Thr Arg Pro Asp Ala Ala Ser Gln Gly Leu Leu  
 340 345 350  
 Arg Pro Ser Asp Ser His Ser Leu Ser Ser Phe Thr Gln Cys Pro Gln  
 355 360 365  
 Asp Ser Ala Leu  
 55 370

<210> 3  
<211> 20  
<212> DNA  
5 <213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Primer01, KD3

10 <400> 3  
tgctcatcaa cgtggaccgc

20

<210> 4  
15 <211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
20 <223> Description of Artificial Sequence: Primer02, KD8

<400> 4  
gcgctaaagt agtacaccag c

21

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat. Application No

PCT/EP 00/06187

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/12 C12N15/62 C07K14/72 C07K19/00 C07K16/28  
G01N33/566

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N C07K G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

BIOSIS

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	WO 00 23588 A (WEICH NADINE S ; GLUCKSMANN MARIA ALEXANDRA (US); MILLENNIUM PHARM) 27 April 2000 (2000-04-27) SEQ.IDs. 5 and 6	1-8, 11
P, X	WO 00 31258 A (ARENA PHARMACEUTICALS INC ; LIAW CHEN W (US); LIN I LIN (US); CHEN) 2 June 2000 (2000-06-02) SEQ.IDs. 3 and 4	1-8, 11
X	DATABASE EMBL 'Online! Accession Number AL042117, 12 March 1999 (1999-03-12) OTTENWAEELDER B. ET AL.: "Homo sapiens mRNA." XP002154864 abstract	4

-/--

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents :

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*&\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

7 December 2000

Date of mailing of the international search report

21/12/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Mandl, B

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat. Application No  
PCT/EP 00/06187

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>DATABASE EMBL 'Online! Accession Number AV064817, 19 June 1999 (1999-06-19) CARNINCI P. ET AL.: "Mus musculus adult male small intestine cDNA." XP002154865 abstract</p>	4
A	<p>WO 97 47316 A (MILLENNIUM PHARMACEUTICALS INC) 18 December 1997 (1997-12-18) page 31, line 4 - line 37</p>	9

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Internat. Application No

PCT/EP 00/06187

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0023588 A	27-04-2000	AU 1211100 A	08-05-2000.
WO 0031258 A	02-06-2000	AU 3790400 A	13-06-2000
		WO 0022131 A	20-04-2000
		AU 6299199 A	01-05-2000
WO 9747316 A	18-12-1997	US 5908609 A	01-06-1999
		US 5932779 A	03-08-1999
		AU 723135 B	17-08-2000
		AU 3383697 A	07-01-1998
		BR 9709684 A	09-05-2000
		CA 2257857 A	18-12-1997
		CN 1227496 A	01-09-1999
		EP 0915706 A	19-05-1999